

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

MULTIPLICATION DE PHAGES ET DE BACTÉRIES EN SOLUTION DE L-TRYPTOPHANE ET EN FONCTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES AU DÉPART

par A. GUELIN et P. LÉPINE (*).

(Institut Pasteur.)

Le rapport phage/bactéries a été de tout temps l'objet de recherches détaillées. L'étude de ce rapport est liée au problème fondamental de la bactériophagie : l'existence, chez le bactériophage, d'un métabolisme indépendant.

L'autonomie des processus de synthèse chez le bactériophage, niée par certains auteurs (Putnam, 1953 [20]), est soutenue par d'autres (Silberg, 1953 [23]). L'introduction dans la biologie expérimentale de l'emploi d'isotopes radioactifs a permis d'entreprendre dans ce domaine une étude biochimique approfondie (Putnam, 1953 [20]). Nous savons maintenant que, bien que les cellules bactériennes soient indispensables à la régénération du bactériophage, celui-ci emprunte une partie de ses éléments au milieu extérieur (Kozloff, Knowlton, Putnam et Evans, 1951 [13], Frank, Putnam et Palm, 1951-1952 [6], Koch, Putnam et Evans, 1952 [12], Watanabe, Stent et Schachman, 1954 [25]). La spéci-

(*) Manuscrit reçu le 20 décembre 1954.

ficité de l'acide nucléique chez le bactériophage, découverte par Wyatt et Cohen en 1952 [28], présente un intérêt particulier ; pour la première fois, une différence qualitative dans la composition chimique du phage et des bactéries a été établie. Weed et Courtenay ont récemment confirmé ce fait (1954 [26]).

Price, en 1947 [49], évoque les difficultés qu'on rencontre à suivre le développement de bactériophage masqué par la croissance bactérienne. Il essaie d'arrêter la division cellulaire par l'introduction de pénicilline. Scribner et Krueger, Krueger et Fong (1937-1938 [22 et 44 bis]), Northrop (1939 [48]) ont déjà obtenu l'augmentation du bactériophage en présence de cultures dont la croissance avait été inhibée.

La possibilité de séparer, ne fût-ce que partiellement, le développement bactériophagique de la croissance cellulaire peut être certainement réalisée par l'intermédiaire des bactéries. Pouvoir non seulement arrêter la croissance de ces dernières, mais encore la diriger, c'est pouvoir intervenir plus intimement dans le système compliqué phage-bactérie. Cependant, les milieux habituels de laboratoire conviennent peu à cette fin. Le bouillon et la peptone varient d'un échantillon à l'autre. Les milieux synthétiques comprennent souvent un nombre considérable de constituants, dont les modifications peuvent entraîner la perte de la valeur nutritive du milieu. Tous ces milieux fournissent, généralement, une culture trop riche et les variations obtenues dans l'intensité de la croissance bactérienne se répercutent difficilement sur le développement du bactériophage.

Au cours de ces dernières années, le rôle des acides aminés et, particulièrement, celui du tryptophane, dans la croissance des phages et des bactéries, a fait l'objet de nombreuses recherches. En 1945, puis en 1946 et 1948, Anderson [4] décrivait l'élévation du titre bactériophagique après addition de L-tryptophane en milieu synthétique F (1). D'après cet auteur, le tryptophane améliorerait la fixation du bactériophage sur les cellules bactériennes. Klein et Maroussenko (1947 [44]) ont également constaté l'action favorable du tryptophane, pour la croissance bactérienne comme pour celle du bactériophage. Fowler et Cohen, Cohen et Fowler, en 1948 [7 et 2], ont noté l'importance du tryptophane en l'introduisant en milieu synthétique, soit seul, soit en combinaison avec d'autres acides aminés. Wollman et Stent, Stent et Wollman, en 1950 [27 et 24], ont confirmé les recherches d'Anderson concernant l'amélioration de la fixation des corpuscules phages par le tryptophane. Jacques Nicolle et Joyeux (1952 [47]), étudiant la

(1) Lactate de sodium, 10,0 ; chlorure d'ammonium, 1,0 ; phosphate bipotassique, 0,7 ; phosphate monopotassique, 0,3 ; sulfate de sodium, 0,1 ; sulfate de magnésium, 0,01 ; eau distillée, 1 000 cm³.

croissance bactérienne en présence des isomères optiques de divers acides aminés, ont constaté l'amélioration des cultures après l'addition de L-tryptophane.

L'étude du rapport phage/bactéries en solution aqueuse de L-tryptophane fait l'objet du présent travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

La souche de bacille paradysentérique Y6R et le bactériophage colidysentérique C16 ont été utilisés dans nos recherches.

La taille du bactériophage C16, déterminée par Lépine, Nicolle et Giuntini en 1942 [15], est de 57 ± 3 m μ .

La solution de L-tryptophane à 0,5 p. 100 est préparée dans l'eau salée à 0,5 p. 100, additionnée de glucose à 30 p. 100 (0,1 cm³ pour 10 cm³ du milieu) et chauffée au bain-marie à 50°, pendant trente minutes. Pour éviter de voir l'activité du tryptophane diminuer avec le temps, une nouvelle solution est préparée tous les dix jours (2).

Au moment de l'expérience, le pH de cette solution est ajusté à 7,4 et la solution est chauffée trente minutes à 50°. Après la répartition de la solution dans des tubes de 17 mm de diamètre (à raison de 1 cm³ par tube), on ajoute 0,05 cm³ d'une suspension bactérienne et 0,05 cm³ de filtrat bactériophagique par centimètre cube (les dilutions de phages et de bactéries varient avec l'expérience). Les tubes sont recouverts avec des capuchons de caoutchouc pour éviter la dessiccation et placés, ensuite, à 37°. Les titrages sont effectués vingt-quatre heures après (avec des pipettes étalonnées) sur une couche de gélose à 1,5 p. 100, préparée avec de la peptone.

Dans la plupart des cas, les recherches ont été effectuées avec deux séries de tubes : l'une pour les cultures contaminées par le phage, l'autre pour les cultures en l'absence de phage. Nous avons pu ainsi suivre, en même temps et dans les mêmes conditions, le développement du bactériophage et celui des bactéries.

L'addition de glucose améliore la croissance des germes et du bactériophage en solution de tryptophane, mais elle n'est pas indispensable ; la culture se développe en son absence. Dans une solution glucosée de tryptophane, la quantité de bactéries s'est trouvée multipliée par 80 (après vingt-quatre heures), au lieu de 30 dans une solution sans glucose. L'augmentation du bactériophage, dans les mêmes conditions, a été de 200 000 et de 3 000.

Par contre, en l'absence de chlorure de sodium, l'élévation du titre du bactériophage n'a pas lieu, malgré la croissance bactérienne. Dans une solution de tryptophane salée, la multiplication

(2) Le L-tryptophane nous a été fourni par les Etablissements Hoffmann-La Roche. Pour éviter d'utiliser des préparations inégalement purifiées, toutes nos recherches ont été faites avec un seul échantillon, le n° 10461.

des bactéries, après vingt-quatre heures, a été de 80 fois, au lieu de 140 en l'absence de sel. Le titre du phage a été augmenté 200 000 fois, tandis que l'absence de sel ne lui permet aucune élévation. La nécessité du chlorure de sodium pour le développement du bactériophage évoque le rôle des électrolytes dans la fixation des corpuscules sur les cellules. Lisbonne et Carrère, en 1923 [16], ont déjà remarqué la nécessité des sels pour la fixation du bactériophage. Gratia (1939 [8]) a montré l'action inhibitrice des solutions riches en électrolytes sur cette fixation. Guelin (1945-1947 [9]) a conclu que la vitesse de fixation de certains phages dépendait de la quantité de sel ajoutée, l'optimum variant suivant la taille des corpuscules.

L'étude du développement du bactériophage en l'absence d'électrolytes doit s'entourer de certaines précautions. Les tubes sont rincés à l'eau bidistillée; le filtrat bactériophagique est fortement dilué, à l'eau bidistillée également. Les bactéries sont lavées avec de l'eau salée à 0,5 p. 100 et reprises (après la centrifugation) avec de l'eau bidistillée, pour être rapidement introduites dans la solution de tryptophane. Dans ces conditions, nous n'avons pas constaté de développement du bactériophage dans une solution de tryptophane non salée.

Dans une solution de tryptophane à pH 4, le développement du bactériophage et des bactéries n'a pas été constaté. Par contre, avec des solutions de pH 6,0, 7,0 et 8,0, l'augmentation des bactéries a été de 60, 80 et 80 fois. La différence de l'augmentation pour le bactériophage (aux mêmes pH) a été plus accentuée : 8 000, 200 000 et 400 000 fois, respectivement.

Le point le plus délicat de nos recherches a été d'éviter d'introduire dans le milieu toute substance azotée autre que le tryptophane. Or, les bactéries et les filtrats bactériophagiques, préparés avec les milieux de laboratoire, rendaient cette tâche difficile. Il fallait faire de fortes dilutions des filtrats bactériophagiques et procéder à de nombreux lavages des bactéries. Malgré ces précautions, dans les tubes témoins ne contenant que de l'eau salée et glucosée, une faible croissance des phages et des bactéries a été souvent constatée (en raison, sans doute, d'une trace de bouillon introduite soit avec les bactéries, soit avec les dilutions de bactériophages).

Pour éviter ces inconvénients, nous avons utilisé une souche bactérienne et un filtrat bactériophagique préparés exclusivement en solution de tryptophane. Les bactéries avaient subi 30 passages en solution salée et glucosée de tryptophane à 0,5 p. 100 (stérilisée par tyndallisation). Chaque passage a été éprouvé quant à la pureté de la culture et à sa sensibilité vis-à-vis du bactériophage C16.

Après le vingt-deuxième passage, la contamination de la culture par un germe de l'air a été constatée. On a procédé à un isolement à partir d'une colonie unique. La colonie a été obtenue sur une couche de gélose à 1,5 p. 100, préparée exclusivement avec de l'eau bidistillée, sans peptone, ni sels (le pH avait été ajusté à 8). Avant l'ensemencement, 0,1 cm³ d'une solution de tryptophane a été étalé à la surface de la gélose. Les colonies sont apparues au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures. Extrêmement petites, elles sont devenues faciles à isoler après trois jours. Un ensemencement plus abondant sur une telle couche faisait apparaître un enduit très fin de bactéries, sur lequel les plages bactériophagiques étaient faciles à obtenir.

L'addition de tryptophane n'est pas obligatoire ; les bactéries se développent aux dépens de la seule gélose préparée avec de l'eau bidistillée, sans peptone. Les plages bactériophagiques ne se produisent pas dans ce cas à cause de la pauvreté de l'enduit bactérien, mais le titre bactériophagique s'élève. Ainsi, les surfaces de gélose sur lesquelles, la veille, les bactéries et les phages ont été ensemencés donnent, après lavage, une augmentation du titre bactériophagique de 70 à 200 fois pour la gélose au tryptophane, et de 8 à 30 fois pour la gélose seule. Un microorganisme non cellulolytique, tel que le bacille paradysentérique, prolifère donc aux dépens d'une solution aqueuse de gélose, entraînant en même temps le développement du bactériophage.

Après 30 passages en solution de tryptophane, nous n'avons pas constaté de grande différence dans la multiplication des bactéries dans ce milieu. L'augmentation de leur quantité a été de 14 fois, contre 10 fois chez les bactéries témoins (cultivées pour la première fois en solution de tryptophane). L'augmentation du bactériophage a été de 20 000 et 17 000 fois, respectivement.

L'âge des bactéries n'est pas un facteur important en ce qui concerne leur croissance en solution de tryptophane. Le début de la culture, chez les bactéries âgées, est plus tardif que chez les jeunes bactéries, mais vingt-quatre heures après, la quantité de germes et de phages est à peu près égale partout. En comparant la multiplication des bactéries âgées de vingt-quatre heures, trois jours et onze jours, nous avons constaté une augmentation bactérienne de 2, 3 et 5 fois ; l'augmentation du phage a été de 10 000 fois partout.

La souche cultivée en solution de tryptophane nous a servi pour la préparation du bactériophage C16, lequel a subi cinq passages successifs dans ce milieu (à partir d'une plage chaque fois). Le bactériophage a été conservé à la glacière, après avoir été centrifugé et chauffé à 56° (la filtration sur bougie Chamberland L2 du bactériophage préparé en solution de tryptophane retient jusqu'à 100 p. 100 des corpuscules).

C'est donc une souche bactérienne et un bactériophage préparés exclusivement en solution de tryptophane qui ont été utilisés dans nos recherches. Nous ne risquons pas, ainsi, d'y introduire une source d'azote autre que le tryptophane.

CROISSANCE DES BACTÉRIES EN SOLUTION DE TRYPTOPHANE.

Le titre des bactéries introduites en solution de tryptophane augmente normalement. La croissance est moins intense que dans le bouillon, limitée, probablement, par l'insuffisance des res-

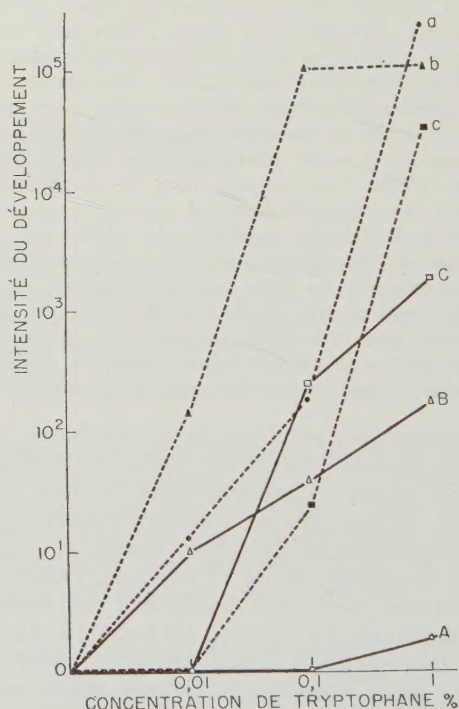


FIG. 1. — Développement des bactéries et du bactériophage en fonction du nombre de bactéries au départ et de la concentration en tryptophane. A, 10 millions de germes au départ ; B, 100 000 germes au départ ; C, 1 000 germes au départ.

Le développement des bactéries A, B et C est d'autant plus intense que leur nombre au départ est plus faible et la concentration de tryptophane plus élevée.

L'intensité de développement du bactériophage, a, b et c, ne correspond pas à celle de la croissance bactérienne.

sources nutritives. Par exemple l'augmentation des bactéries en bouillon ou en eau peptonée a été d'environ 2 millions de fois et de 8 000 fois seulement en solution de tryptophane (l'augmentation du bactériophage, dans ces conditions, a été respectivement de 100, 40 et 20 millions.

L'intensité de la croissance bactérienne en solution de tryptophane n'est pas toujours la même. Elle peut varier dans de très

larges mesures et dépend de deux facteurs : a) la quantité de tryptophane, et b) la quantité de bactéries introduites au début de l'expérience.

En présence de la même concentration de tryptophane, la croissance bactérienne est d'autant plus faible que la quantité de germes introduite au départ est plus grande. Cette croissance peut être réduite au minimum (et même ne pas se révéler avec les moyens actuels de titrage) dans le cas de germes trop nombreux par rapport aux ressources nutritives du milieu. Ainsi, en solution de tryptophane toujours à 1 p. 100, 10 millions de bactéries ont augmenté 2 fois, 100 000 bactéries 180 fois et 1 000 bactéries 3 000 fois. D'autre part, 100 000 bactéries ont augmenté 180 fois en solution à 1 p. 100, 40 fois en solution à 0,1 p. 100 et 10 fois en solution à 0,01 p. 100 (fig. 1).

Il en résulte que l'emploi d'un milieu pauvre, tel que la solution de tryptophane, exige l'introduction d'un nombre très faible de germes au départ.

Les résultats représentés dans la figure 1 expriment le rapport quantitatif entre le microorganisme et le milieu. *L'intensité de la croissance bactérienne est d'autant plus grande que la solution de tryptophane est plus concentrée et le nombre des bactéries au départ plus faible.*

DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE

EN PRÉSENCE DE CONCENTRATIONS BACTÉRIENNES DIFFÉRENTES.

La multiplication des corpuscules phages en solution de tryptophane dépend, avant tout, de la quantité qu'on en a introduite au départ : moins les corpuscules sont nombreux, plus grande sera leur augmentation. Dans les mêmes conditions, 500 corpuscules ont été augmentés 8 000 fois, tandis que 500 000 corpuscules ont été augmentés 40 fois seulement (fig. 2). Ce fait confirme les résultats de d'Hérelle (1926 [10]) et de Northrop (1939 [18]) avec les phages des bactéries aérobies ; ceux de Guelin (1949 [9]) et d'Elford, Guelin, Hotchin et Challice (1953 [5]) avec les phages des anaérobies.

La nécessité d'avoir, pour le développement du bactériophage, des cellules bactériennes en voie de division donne à penser qu'en présence d'une culture abondante le développement du bactériophage sera meilleur. Or, ce n'a pas toujours été le cas dans nos expériences. Le titre final du bactériophage n'a pas été très différent, qu'il se soit multiplié en présence d'une culture riche ou d'une culture médiocre. Par exemple, 5 000 corpuscules se sont multipliés à peu près 1 000 fois en présence de deux cultures dont l'augmentation a été de 26 et de 10 000 fois (fig. 2).

En introduisant toujours 100 corpuscules phages dans une série

de tubes contenant au départ une quantité différente de germes (50 millions, 6 millions, 600 000, 40 000, 10 000, 1 000, 60 et 6 bactéries) nous avons constaté que malgré la prolifération très inégale des bactéries (de 1,2 à 270 000 fois), le titre bactériophagique était partout à peu près le même [de 4 à 16 millions par centimètre cube (fig. 3)] (3).

Les résultats exprimés par les figures 2 et 3 montrent que la

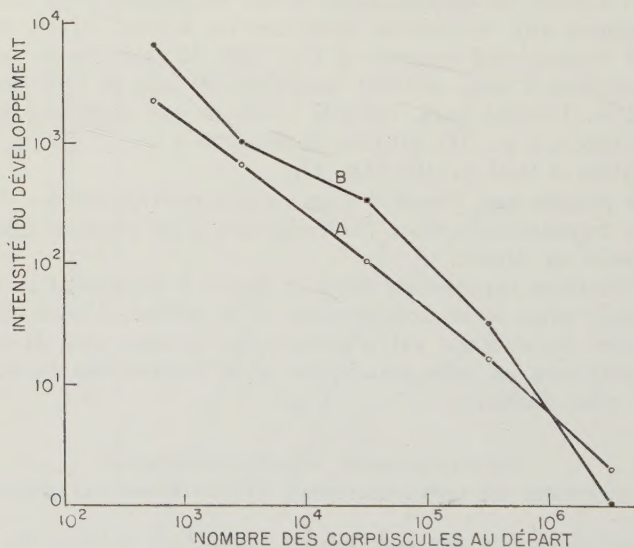


FIG. 2. — Développement du bactériophage en fonction du nombre de corpuscules au départ et de la croissance bactérienne.

A, corpuscules phages en présence de bactéries se multipliant 26 fois ; B, corpuscules phages en présence de bactéries se multipliant 10 000 fois.

Le développement des corpuscules phages est d'autant plus intense que leur nombre au départ est plus faible.

Malgré une croissance différente des bactéries ($\times 10\,000$ et $\times 26$ fois), le développement des corpuscules phages est à peu près le même.

multiplication des corpuscules phages est d'autant plus grande que leur nombre au départ est plus faible. Cette multiplication ne correspond pas toujours à l'intensité de la croissance bactérienne.

En recherchant pourquoi le développement du bactériophage ne suit pas toujours la croissance bactérienne, nous avons cons-

(3) A l'exception du premier tube, où, en raison d'un nombre trop élevé de germes au départ (50 millions), la croissance bactérienne ne s'est pas manifestée.

taté que, malgré la présence de nombreuses bactéries en division, le début de la multiplication des corpuscules peut être retardé. Ce retard dépend directement du nombre des bactéries introduites au départ dans la culture.

Nous avons suivi heure par heure le développement de

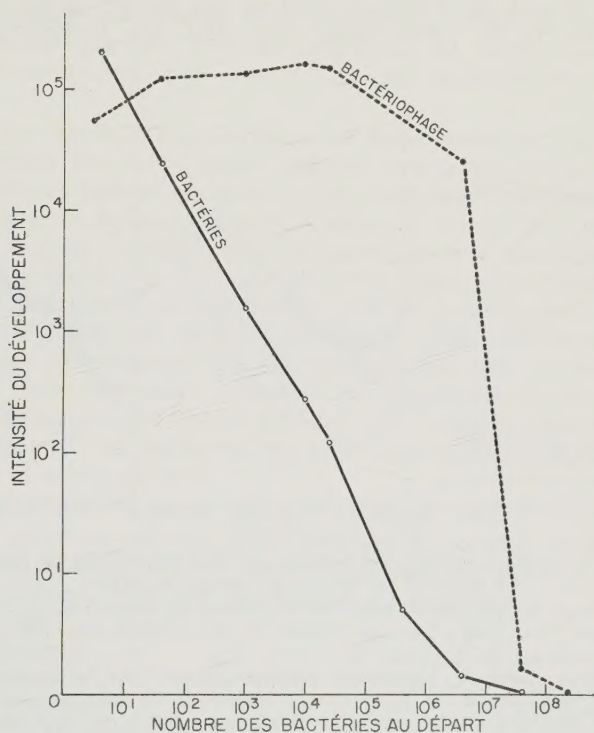


FIG. 3. — Développement du bactériophage en fonction de la croissance bactérienne.

La croissance bactérienne en solution de tryptophane est d'autant plus grande que le nombre de germes au départ est plus faible.

Quelle que soit la croissance bactérienne, l'augmentation du bactériophage est à peu près la même.

180 corpuscules phages introduits dans deux cultures ; l'une contenant au départ 360 000 germes, l'autre 380 germes par centimètre cube. Bien que la croissance bactérienne dans les deux cultures ait été constatée au bout de deux heures, l'augmentation du titre bactériophagique a commencé après deux heures dans la culture de 360 000 bactéries et après dix heures seulement dans celle de 380 bactéries (fig. 4).

Commencée en même temps, la croissance bactérienne dans les deux cultures a été de durée différente : de quinze à seize heures avec 380 germes au départ et de neuf heures seulement dans le cas de 360 000 germes (l'arrêt de la croissance a été probablement causé, entre autres, par l'épuisement du milieu par des bactéries plus nombreuses).

L'accroissement des bactéries avant la lyse de la culture s'effectua à peu près de la même façon que celui des bactéries témoins

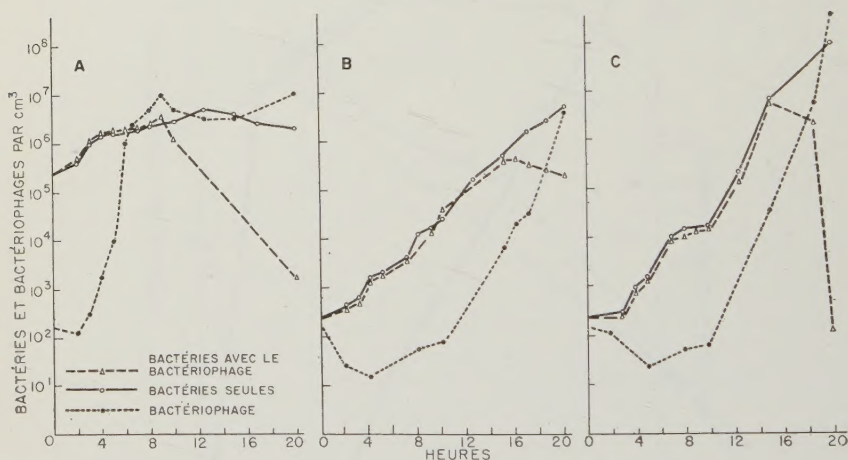


FIG. 4. — Développement des bactéries et du bactériophage en fonction du temps et du nombre de germes au départ.

A, en solution de tryptophane avec 360 000 germes au départ ; B, en solution de tryptophane avec 380 germes au départ ; C, en bouillon avec 380 germes au départ.

Malgré la croissance bactérienne constatée partout dès le début de l'expérience, l'augmentation du bactériophage commence d'autant plus tard que les bactéries sont moins nombreuses au départ (en solution de tryptophane et en bouillon également).

(sans bactériophage). Ce fait a été observé en 1930 par Krueger et Northrop [14] et par Elford, Guelin, Hotchin et Challice en 1953 [5].

La lyse est intervenue lorsque la croissance bactérienne a été près de son maximum. La libération massive de phages n'a pas été observée après la lyse. Delbrück et Luria (1942 [4]), Cordts (1942 [3]) supposent que la lyse bactérienne est un phénomène accessoire, indépendant de la libération des corpuscules. Guelin la considère comme une réaction cellulaire non spécifique, provoquée par le bactériophage (1948 [9]).

L'expérience a été effectuée avec 3 cm³ de solution de tryptophane. Des observations analogues, faites en bouillon avec 380 germes au départ, ont donné, au cours des premières heures, des résultats semblables. Toutefois, une culture plus riche et un titre bactériophagique plus élevé ont été constatés en bouillon à la fin de l'expérience (fig. 4, C).

Le début tardif du développement du bactériophage permet de comprendre pour quelle raison son titre final ne correspond pas à l'intensité de la croissance bactérienne. Pour obtenir une prolifération intense des bactéries dans une solution de tryptophane, il faut en introduire peu au départ. Or, c'est justement avec peu de germes au départ que le commencement du développement du bactériophage est retardé. Les premières générations de jeunes cellules seront perdues pour la formation du bactériophage et son titre sera bas par rapport à la prolifération de la culture.

Par contre, dans le cas de bactéries nombreuses au départ, le développement des corpuscules phages commence dès le début. Mais ce développement est arrêté avant d'atteindre son maximum, car la culture est de courte durée. C'est ainsi que le titre bactériophagique peut être à peu près le même malgré une croissance bactérienne très inégale de deux cultures. Chez l'une (avec 600 000 bactéries par exemple), l'augmentation a été de 7 fois ; chez l'autre (avec 60 bactéries), de 40 000 fois. Malgré cette différence dans la croissance bactérienne, les 100 corpuscules phages introduits au début dans les deux cultures ont augmenté d'une façon presque identique : 160 000 et 140 000 fois. Dans le premier cas, le développement du bactériophage a été arrêté précocement, dans le second, il a débuté tard.

La vitesse avec laquelle le bactériophage peut atteindre les limites de son titre dépend directement de la quantité de germes introduite au départ. Les 100 corpuscules phages, placés dans les mêmes conditions, vont être augmentés au maximum :

après 6 heures	avec 100 000 bactéries
après 9 heures	avec 50 000 bactéries
après 12 heures	avec 10 000 bactéries
après 12 à 13 heures	avec 5 000 bactéries.

Ce fait peut aussi s'expliquer par une différence dans le début du développement du bactériophage en fonction du nombre de germes au départ.

Il en résulte que, dans les conditions de l'expérience, le début du développement du bactériophage dépend de la quantité de germes introduits dans la culture : moins on introduit de germes au départ, plus tard commence le développement du bactériophage.

Le début tardif du développement du bactériophage, malgré la présence de cellules bactériennes en voie de division, ne lui permet d'atteindre qu'un titre bas par rapport à la croissance de la culture.

FIXATION DU BACTÉRIOPHAGE
EN FONCTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES.

Nous avons recherché la cause du début tardif du développement du bactériophage mis en présence d'une faible quantité de germes au départ. Nous avons constaté que les corpuscules ne se fixent qu'en présence d'un nombre élevé de cellules bactériennes. Ainsi, la fixation du bactériophage en présence de 200 millions de bactéries a été de 99 p. 100. Par contre elle a été nulle avec 20 000 germes par centimètre cube.

La différence du nombre des corpuscules phages n'a pas beaucoup influencé leur fixation en présence de 200 millions de bactéries : au bout d'une heure, sur 100 millions de corpuscules, 94 p. 100 ont été fixés ; sur un million de corpuscules, 97 p. 100 ; sur 10 000 corpuscules, 99 p. 100.

Nous avons été amenés à étudier l'intensité de la fixation des corpuscules phages en présence de quantités différentes de bactéries. La méthode décrite par Krueger et Northrop en 1930 [14] et par Schlesinger en 1932 [21] a été utilisée pour ces recherches.

Détermination de la quantité de bactériophage fixé sur les bactéries.

— Des bactéries de vingt-quatre heures cultivées sur gélose peptonée sont prélevées avec 10 cm³ d'eau physiologique (par tube de gélose). Titrage des bactéries. Chauffage des suspensions au bain-marie à 58°, pendant soixante minutes. Au cours du chauffage, la suspension bactérienne est agitée toutes les dix minutes. On éprouve l'efficacité du chauffage sur les bactéries, en ensemençant celles-ci en bouillon glucosé. La suspension peut être conservée à la glacière pendant quelques jours et servir pour une série d'expériences.

Pour étudier la fixation, un nombre connu de corpuscules est introduit dans la suspension bactérienne chauffée et titrée. Chez le témoin, la suspension bactérienne est remplacée par de l'eau physiologique. Le tout est placé à 37° pendant deux heures. On procède ensuite au titrage du bactériophage libre.

Les corpuscules, une fois fixés sur les bactéries chauffées, ne peuvent plus être libérés et sont perdus pour le titrage ; celui-ci ne révèle que les corpuscules libres, non fixés. Connaissant la quantité totale de bactériophage introduite au début de l'expérience, il est possible, par soustraction, de trouver le nombre de corpuscules fixés.

L'emploi de bactéries chauffées est préférable pour l'étude de la fixation en série. Les bactéries vivantes nécessitent des manipulations rapides et certaines précautions, afin d'éviter une multiplication des germes, susceptible d'entraîner le développement du bactériophage. Les manipulations supplémentaires, pour éliminer ou tuer les germes avant les titrages (centrifugation, filtration ou chauffage), prolongent la durée de l'expérience et sont parfois difficiles à réaliser avec une série de tubes. D'autre part, la filtration sur bougie peut retenir jusqu'à 100 p. 100 des corpuscules ; la diminution du titre bactério-

phagique pendant le chauffage est inégale et dépend de la concentration des bactéries ; la centrifugation donne de meilleurs résultats, à la condition d'une sédimentation totale des germes, ce qui n'est pas toujours le cas.

L'emploi de bactéries chauffées permet de mettre en évidence le bactériophage fixé, à quelques corpuscules près. Certaines recherches peuvent cependant nécessiter des bactéries vivantes. Krueger et Northrop [14] n'ont pas constaté une grande différence dans la fixation du bactériophage sur les bactéries vivantes ou tuées. Par contre, Schlesinger [21] a montré que la fixation sur les bactéries vivantes est 2 à 3 fois plus grande que sur les bactéries chauffées. D'après lui, certains phages ne sont fixés que par les germes vivants.

Au cours de nos recherches, nous avons constaté qu'en présence de suspensions bactériennes contenant des quantités différentes de germes, le pourcentage de bactériophage fixé est très variable. Avec des suspensions contenant de 60 millions à 3 milliards de germes par centimètre cube, la fixation (de 60 000 corpuscules) a été de 94 à 99,8 p. 100 ; avec 30 millions de germes, elle n'était que de 50 p. 100 ; avec 600 000 germes, aucune fixation n'a été observée.

Ces résultats exposés dans la figure 5 indiquent que la fixation du bactériophage sur les cellules bactériennes ne s'établit qu'à partir d'un nombre de germes assez élevé. Krueger et Northrop [14], Schlesinger [21], étudiant la fixation du bactériophage, tenaient compte du nombre de bactéries utilisées. Guélin (1947 [9]) a observé que le pourcentage de corpuscules fixés baissait à mesure que la quantité de bactéries diminuait.

La diminution brusque de la fixation (de 95 p. 100 à 35 p. 100), observée après la réduction du nombre des bactéries de 60 à 20 millions par centimètre cube (fig. 5), fait penser à des changements de conditions dans lesquelles les corpuscules sont diffusés dans le milieu. Krueger et Northrop [21] considéraient cependant que la répartition des corpuscules s'effectuait suivant la « law of normal distribution », et dépendait non de leur diffusion à travers le milieu, mais d'une réaction survenue au moment de leur contact avec la surface bactérienne. Ces auteurs n'ont constaté aucun changement dans la fixation des corpuscules lorsqu'ils les introduisaient dans des milieux de viscosité différente.

Pour accélérer le départ du développement du bactériophage en présence d'un petit nombre de germes, nous avons procédé à une fixation préalable des corpuscules sur les bactéries.

Des bactéries vivantes (cultivées en solution de tryptophane pendant douze heures) sont centrifugées et le culot est repris avec de l'eau physiologique (de façon à avoir une suspension bactérienne concentrée). La suspension est divisée en deux parties : l'une (A) reçoit le bacté-

riophage, l'autre (B) la même quantité d'eau physiologique. Le témoin (C), chez qui la suspension bactérienne est remplacée par de l'eau physiologique, reçoit la même quantité de bactériophage que le tube A. Le tout est placé à l'obscurité à 17° pendant deux heures, afin de laisser aux corpuscules le temps de se fixer, au maximum, sur les bactéries. Sur 5 millions de corpuscules introduits avant la fixation, 98 p. 100 ont été fixés par 800 millions de bactéries.

Après deux heures, le contenu des tubes A et B est dilué 1 000 fois

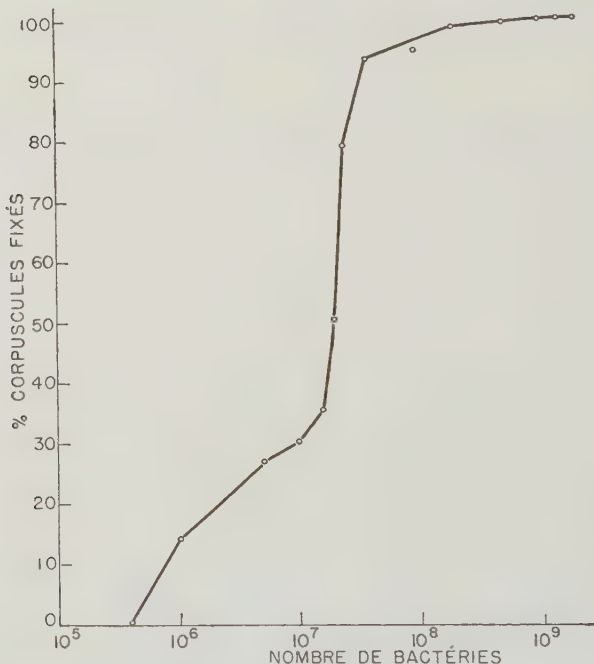


FIG. 5. — Fixation du bactériophage sur les bactéries en fonction du nombre de germes.

La fixation des corpuscules phages sur les bactéries ne s'effectue qu'en présence d'un nombre élevé de bactéries.

La diminution du nombre des bactéries de 60 à 20 millions par centimètre cube a entraîné une diminution brusque de la fixation (de 95 p. 100 à 35 p. 100).

avec une solution de tryptophane (afin de n'avoir qu'un petit nombre de germes au départ). Le tube B reçoit à partir du tube C autant de bactériophage que le tube A en contient (après dilution 1 000 fois de son contenu).

Nous avons ainsi, dans les deux tubes A et B, à peu près la même quantité de bactéries et de bactériophages. Mais, dans le tube A, le bactériophage a été préalablement fixé sur les cellules bactériennes, tandis que dans le tube B le bactériophage, introduit après la dilution

(1 000 fois) des bactéries, n'était pas fixé sur les cellules, peu nombreuses.

Les deux tubes sont ensuite placés au bain-marie à 37°. Les titrages sont effectués toutes les heures.

Les résultats de l'expérience (fig. 6) ont montré que le développement du bactériophage, en présence d'un petit nombre de

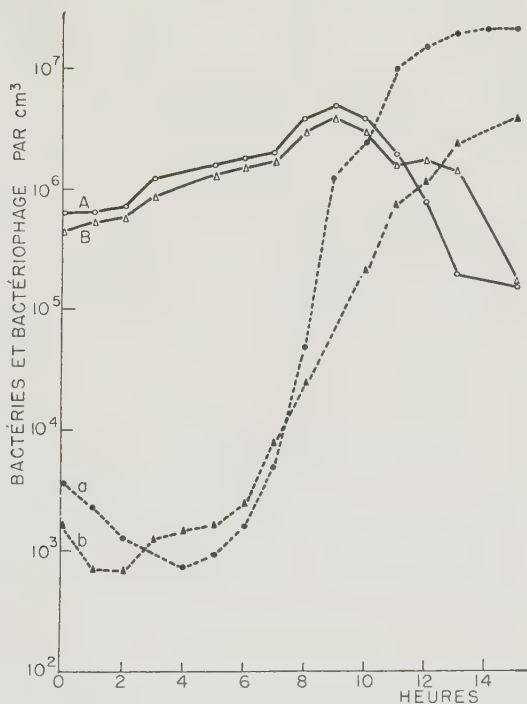


FIG. 6. — Développement du bactériophage fixé préalablement sur les bactéries.

A et B, bactéries ; a, bactériophage fixé sur les bactéries avant l'expérience ; b, bactériophage témoin, non fixé avant l'expérience.

Le début du développement du bactériophage (a) fixé préalablement sur les bactéries (A) n'est pas accéléré par rapport à celui du phage témoin (b), non fixé avant l'expérience.

bactéries, n'était pas accéléré par une fixation préalable des corpuscules sur ces bactéries. Le début tardif du développement des corpuscules phages, déjà fixés sur les cellules en division, n'est pas en accord avec la faculté que possède le bactériophage de se reproduire à partir d'un seul corpuscule. Sur des milliers de corpuscules fixés sur les bactéries, quelques-uns au moins

auraient pu se reproduire aux dépens des bactéries-hôtes. Cependant, le nombre des bactéries a été fortement réduit par la dilution au début de l'expérience. Les jeunes corpuscules, une fois formés et libérés, se trouvaient, probablement, dans l'impossibilité de se fixer sur les bactéries peu nombreuses. Seule la prolifération bactérienne, en augmentant le nombre des germes, permit enfin leur fixation. A partir de ce moment, leur multiplication s'est poursuivie parallèlement à la croissance bactérienne.

Le début tardif du développement du bactériophage, malgré la présence de cellules en voie de division, peut être expliqué par l'absence de fixation des corpuscules sur les bactéries peu nombreuses. La fixation des corpuscules phages sur les bactéries nécessite un nombre élevé de germes.

RÉSUMÉ.

1° Le bacille paradysentérique Y6R et le bactériophage colidysentérique C16 se multiplient en solution de L-tryptophane, à la condition de n'introduire au départ qu'un petit nombre de bactéries.

2° Malgré la présence de cellules bactériennes en voie de division, le développement du bactériophage commence d'autant plus tard que le nombre des bactéries au départ a été plus faible.

3° Le début tardif du développement du bactériophage peut s'expliquer par l'absence de fixation des corpuscules sur des bactéries peu nombreuses. La fixation du bactériophage exige une forte concentration bactérienne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. F. ANDERSON. *J. Cell. comp. Physiol.*, 1945, **25**, 17 ; *Cold Spring Harbor Symp. quantit. Biol.*, 1946, **11**, 1 ; *J. Bact.*, 1948, **55**, 637.
- [2] S. S. COHEN et C. B. FOWLER. *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 275.
- [3] E. CORDTS. *Thesis for M. A. degree*. Vanderbilt Univers., 1942 (cité d'après Delbrück et Luria).
- [4] M. DELBRÜCK et S. S. LURIA. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 111.
- [5] W. J. ELFORD, A. M. GUELIN, J. E. HOTCHIN et C. E. CHALLICE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 319.
- [6] E. EVANS, Y. FRANK, F. PUTNAM et L. PALM. *Feder. Proc.*, 1951, **10**, 181, et 1952, **11**, 209.
- [7] C. B. FOWLER et S. S. COHEN. *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 259.
- [8] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 62.
- [9] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1945, **71**, 487 ; 1947, **73**, 496 ; 1948, **75**, 472 ; 1949, **77**, 40.

- [10] F. D'HÉRELLE. *Le Bactériophage et son comportement*, Masson édit., Paris, 1926. *Phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses*, Masson édit., 1938.
- [11] B. J. KLEIN et T. MAROUSSENKO (cité d'après KLEIN, *Ouspckhi Sovr. Biol.*, 1954, **37**, 291).
- [12] A. KOCH, F. PUTNAM et E. EVANS. *J. biol. Chem.*, 1952, **197**, 113.
- [13] L. M. KOZLOFF, K. KNOWLTON, F. W. PUTNAM et E. EVANS. *J. biol. Chem.*, 1951, **188**, 101.
- [14] A. KRUEGER et J. NORTHROP. *J. gen. Physiol.*, 1930-1931, **14**, 223.
- [14 bis] A. KRUEGER et FONG. *J. gen. Physiol.*, 1937-1938, **21**, 137.
- [15] P. LÉPINE, P. NICOLLE et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1942, **68**, 503.
- [16] LISBONNE et L. CARRÈRE. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 865.
- [17] J. NICOLLE et Y. JOYEUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2495.
- [18] J. NORTHROP. *J. gen. Physiol.*, 1939, **23**, 59 ; *Cristalline enzymes*, Columbia, 1939.
- [19] W. H. PRICE. *J. gen. Physiol.*, 1947-1948, **31**, 119, 127 et 135.
- [20] F. W. PUTNAM. *Advances in protein chemistry*, 1953, **8**, 175.
- [21] M. SCHLESINGER. *Z. Hyg.*, 1933, **114**, 136, 149 et 161.
- [22] S. SCRIBNER et A. KRUEGER. *J. gen. Physiol.*, 1937-1938, **21**, 1.
- [23] L. SILBERT. *Microbiologia*, 1953, **22**, 81.
- [24] G. S. STENT et E. L. WOLLMAN. *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **6**, 307.
- [25] J. WATANABE, G. S. STENT et H. K. SCHACHMAN. *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 38.
- [26] L. L. WEED et TH. A. COURTENAY. *J. biol. Chem.*, 1954, **206**, 735.
- [27] E. L. WOLLMAN et G. S. STENT. *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **6**, 292.
- [28] G. R. WYATT et S. S. COHEN. *Nature*, 1952, **170**, 1072.

ÉLECTROPHORÈSE ET DIAGNOSTIC DE LA RAGE

par M.A. CHABAUD, CH. SÉRIÉ et L. ANDRAL (*).

(Institut Pasteur d'Ethiopie.)

Au cours d'enquêtes poursuivies sur le comportement électrophorétique de sérums humains et animaux, nous avons observé que la rage du chien se traduisait par des modifications aisément visibles sur les tracés.

Nous avons voulu préciser l'intérêt de ces données et rechercher si l'électrophorèse permettait au laboratoire de dépister précocement la maladie rabique.

A. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

1° APPAREILLAGE. — Nous avons travaillé avec l'appareil de microélectrophorèse sur papier de Machebœuf-Rebeyrotte, d'après les instructions des constructeurs.

L'appareil étant branché sur « basse tension » (110 volts), la durée de l'électrophorèse est de quatre heures. Les bandes utilisées (6 × 25 cm) sont en papier « Arches 301 ».

Les sérums sont dilués au demi avec une solution tampon à pH 8,6 selon les méthodes standard.

La révélation est faite dans une solution de bromophénol à 0,1 p. 1000 pendant dix-huit heures. Elle est suivie de trois lavages dans une solution d'acide acétique à 2 p. 100. L'opération est terminée par un dernier bain dans une solution à parties égales d'acide acétique à 2 p. 100 et d'acétate de soude à 0,5 p. 100.

Une fois l'électrophorèse terminée, le papier est aussitôt porté dans le révélateur sans séchage préalable, ce qui permet d'obtenir de meilleurs tracés que par la méthode originale. Après révélation, la bande est mise à sécher à l'étuve à sec à 80° C.

2° TRACÉS. — Seuls, les tracés obtenus au cours d'une même électrophorèse peuvent être comparés entre eux. Nous avons donc disposé sur chaque bande de papier un sérum suspect à étudier (S. S.) et en regard un sérum témoin (S. T.) appartenant à la même espèce animale.

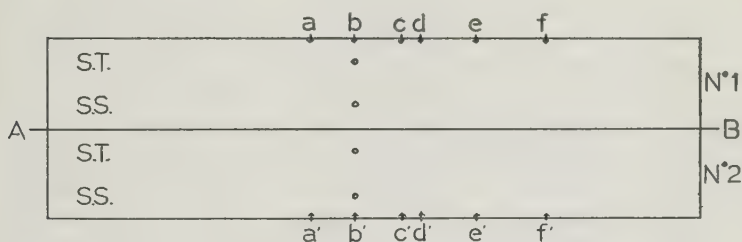
(*) Manuscrit reçu le 1^{er} octobre 1954.

Dans certains cas, où l'œil est incapable d'évaluer les nuances des fractions à comparer, nous avons eu recours à la méthode colorimétrique suivante :

Le sérum suspect et son témoin sont disposés sur une même bande selon le schéma 1.

La révélation terminée et après séchage, chaque fraction protidique est repérée par des flèches disposées de part et d'autre de la bande (*aa'*, *bb'*, *cc'*...).

Le papier est alors découpé selon l'axe A B en deux parties 1 et 2. La partie n° 1 servira de référence, la partie n° 2 sera morcelée autant de fois qu'il y a de fractions repérées.



SCHEMA 1.

Chacun de ces morceaux est placé dans un tube à hémolyse contenant 4,5 cm³ de la solution [1] :

Chlorure de sodium	8 g
Carbonate de sodium	0,50 g
Bicarbonate de sodium	0,50 g
Eau	1 000 g

Les protéines colorées s'éluent totalement dans le milieu en douze heures à 37° C. Il ne reste plus qu'à titrer le contenu des tubes en degrés photométriques (photomètre de Meunier, écran vert, cuve Rufisque).

3° GRAPHIQUES. — Connaissant le titre en degrés photométriques de chacune des fractions, on peut mesurer en millimètres la longueur de leurs plages respectives en se reportant à la demi-bande de référence n° 1.

On construit alors un graphique en portant en ordonnées les degrés photométriques et en abscisses la longueur des différentes fractions (1).

(1) Afin de faciliter la confrontation des étalements et de leur représentation, nous avons reproduit au-dessous de chaque graphique la demi-bande de référence n° 1.

Cette méthode, malgré les erreurs qui l'entachent, permet de comparer chaque fraction d'un sérum suspect avec son homologue d'un sérum témoin.

4° LES SÉRUMS. — Chaque sérum a été obtenu par centrifugation, le sang ayant été recolté du vivant ou après la mort des animaux (voir tableau final).

D'une façon générale, la rage et la maladie d'Aujesky

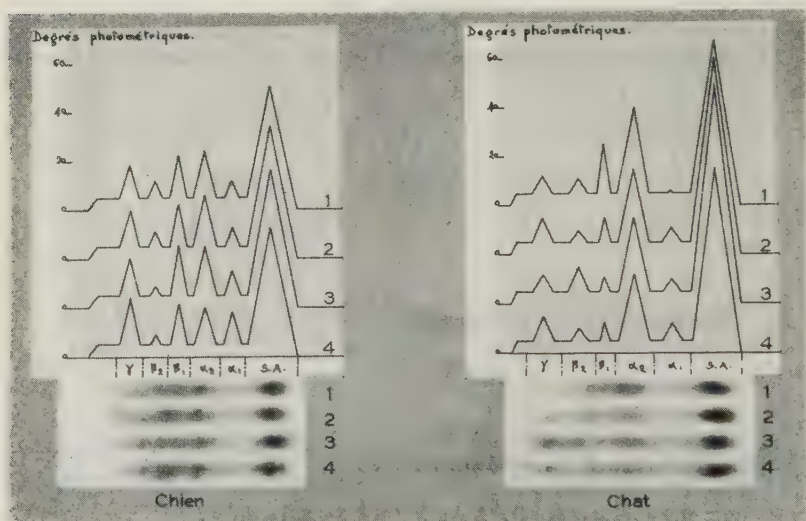


FIG. 1. — Sérums d'animaux sains : chien, chat.

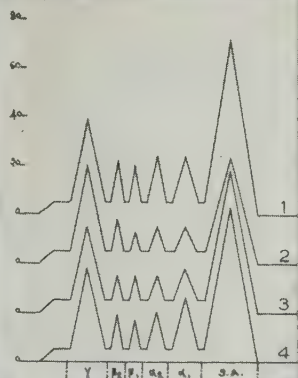
Remarquer le parallélisme des différents tracés obtenus avec les sérums d'animaux d'une même espèce. Le fond coloré des bandes électrophorétiques a été évalué à 5 degrés photométriques (photomètre de Meunier).

entraînent une fragilité globulaire d'autant plus marquée que l'animal approche de l'agonie.

Nous n'avons pas pu remédier à la diffusion de l'hémoglobine qui, mobilisée au cours de l'électrophorèse, ira surcharger la zone des globulines β qu'elle masquera ; dans les cas extrêmes, elle empêchera la migration des autres fractions protidiques jusqu'à rendre les tracés illisibles.

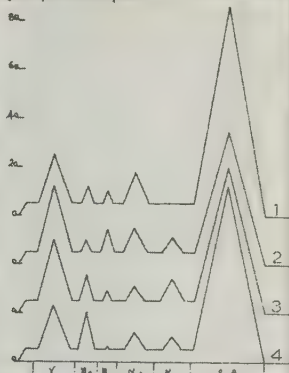
Lorsqu'un sérum suspect n'est que légèrement hémolysé, il reste possible d'en comparer les fractions à celles de son témoin et de construire les graphiques des deux sérums. Il suffit d'ajouter de l'eau distillée au sérum témoin encore sur son caillot, jusqu'à l'apparition d'une hémolyse dont le degré photométrique corresponde à celui du sérum à étudier.

Degrés photométriques.



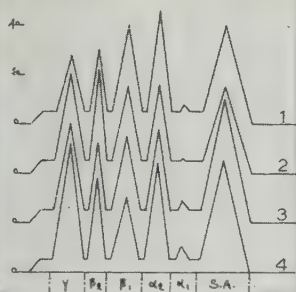
Âne

Degrés photométriques.



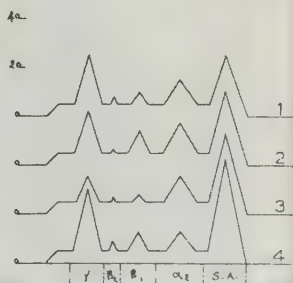
Mouton

Degrés photométriques.



Cheval

Degrés photométriques



Vache

FIG. 2. — Sérums d'animaux sains : âne, cheval, mouton, vache.
Mêmes remarques que pour la figure 1.

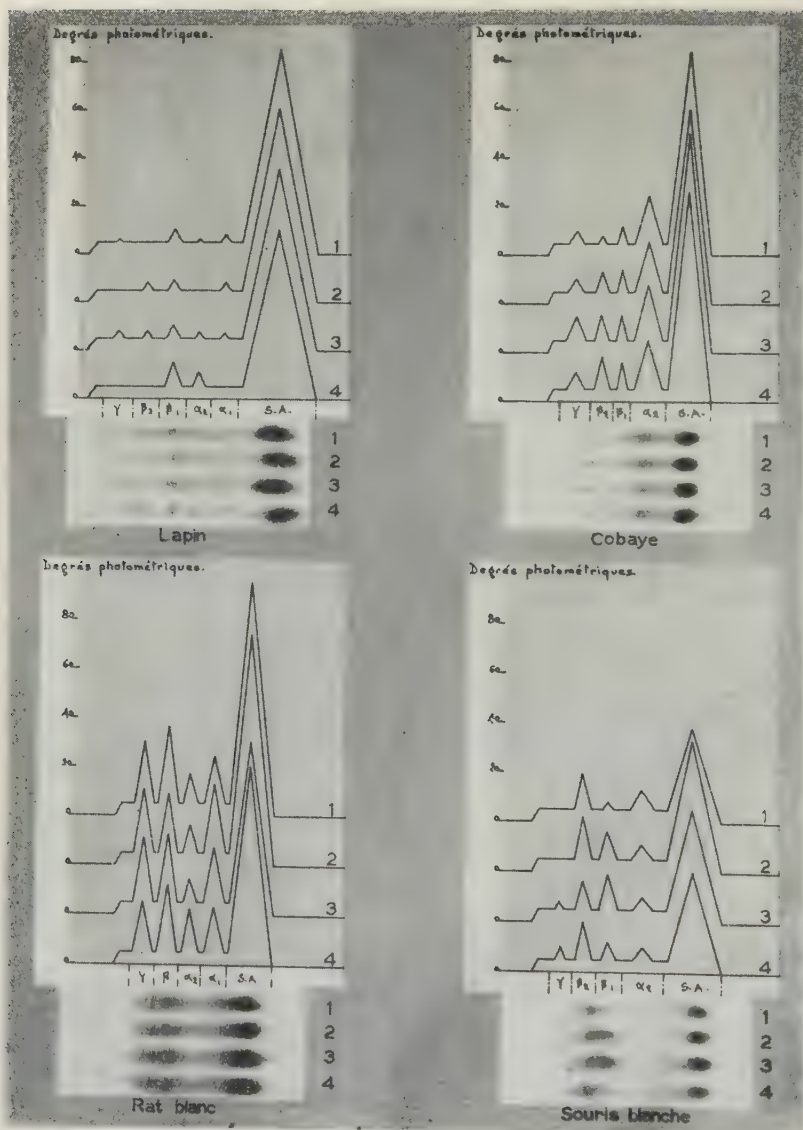


FIG. 3. — Sérums d'animaux sains : lapin, cobaye, rat blanc, souris blanche.
Mêmes remarques que pour la figure 1.

5° CONTRÔLE EXPÉRIMENTAL. — Tous les sérums utilisés proviennent d'animaux sur lesquels le diagnostic de rage a été contrôlé par les techniques classiques de l'histologie et des épreuves biologiques (voir tableau final).

B. — CARACTÉRISTIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES DES SÉRUMS.

1° SÉRUMS D'ANIMAUX SAINS (2). — Nous reproduisons (fig. 1, 2 et 3) quelques tracés provenant : les uns, d'animaux fréquemment atteints de rage en Éthiopie, le chien en premier lieu, puis le chat et d'une façon accidentelle les herbivores domestiques : cheval, âne, vache, mouton ; les autres, d'animaux d'expérience : lapins, cobayes, souris blanches, rats blancs.

De leur analyse, il résulte que :

a) Chien, chat, cheval, âne, mouton, lapin présentent une répartition protidique identique à celle rencontrée chez l'homme et donc, justiciable de la terminologie classique.

b) Vache, cobaye, souris blanche ne montrent qu'une tache dans la région des globulines α .

Nous l'avons appelée globuline α_2 du fait que cette fraction globulinique est augmentée dans la rage de ces animaux et par analogie avec la fraction sérique dont la modification autorise ce diagnostic dans les autres espèces animales.

c) Chez le rat blanc, nous n'avons pas pu dissocier les globulines β_2 des globulines β_1 .

Nous les avons groupées sous le terme β .

2° SÉRUMS D'ANIMAUX ATTEINTS DE RAGE NATURELLE. — a) *Chien, Chat, Cheval, Âne, Vache*. — Les figures 4, 5 et 6 reproduisent 21 de nos 34 tracés électrophorétiques provenant d'animaux atteints de rage naturelle (exception chat R.96, inoculé avec le cerveau du chien R.90).

Ces tracés montrent :

1° Une augmentation très marquée des globulines α_2 , dont la tache se signale avec netteté dès l'immersion de la bande dans le bain révélateur ;

2° Une légère augmentation des sérum-albumines ;

3° Des surcharges variables des globulines γ se retrouvant communément au cours d'affections les plus diverses.

b) *Lapin, Cobaye, Souris blanche, Mouton, Rat blanc*. — Les animaux appartenant aux trois premières espèces ne présentent des modifications de leurs globulines α_2 que dans 40 p. 100 des

(2) Est appelé « animal sain », ou plus généralement « animal témoin » (d'où sérum témoin S.T.) tout animal indemne de rage ou d'affection aiguë cliniquement décelable.

cas environ. L'augmentation de ces globulines, quand elle existe, est toujours moindre que chez le chien.

Par contre, mouton et rat blanc inoculés ou atteints de rage

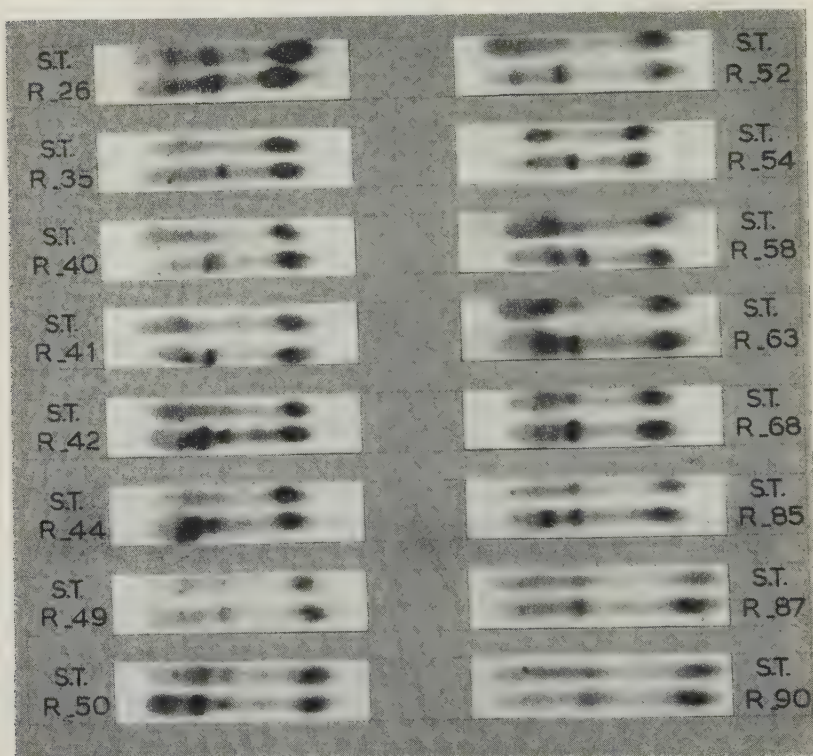


FIG. 4. — Sérums de chiens enrégés.

Noter sur l'ensemble des sérums étudiés l'augmentation des globulines α_2 . R.40 : dédoublement des globulines α_2 de cause inconnue. R.26, R.41, R.42, R.49, R.50, R.58, R.63, R.85 : on remarque une augmentation des globulines β . Cette augmentation correspond à une surcharge de ces dernières par l'hémoglobine contenue dans ces sérums. R.50 : nette augmentation des globulines γ qui se retrouve au cours de nombreuses affections ; dans le cas présent, elle avait été provoquée par la piroplasmose.

naturelle (mouton R.88) ne montrent aucune modification électrophorétique appréciable.

3° SÉRUMS DE L'HOMME ATTEINT DE RAGE. — Nous avons recolté quatre sérums d'hommes rabiques (voir fig. 7, cas RH.2, RH.4).

Sur leur tracé, on remarque :

Une augmentation des globulines α_2 (surtout nette dans le tracé RH.4).

Une augmentation des globulines β_1 et α_1 (cas RH.2).

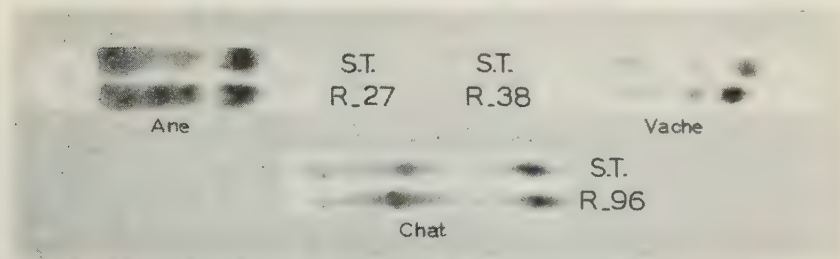


FIG. 5. — Sérum d'animaux enrégés : âne, vache, chat.

R. 27 : âne rabique présentant une augmentation des globulines α_2 jumelée à celle des globulines α_1 . R.38 : vache enrégée ; les globulines α_2 , bien qu'augmentées, ne sont pas aussi accusées que dans le sérum des chiens rabiques. R.96 : chat inoculé avec le virus des rues du chien R.90 à l'isolement ; le sérum témoin est son propre sérum avant l'inoculation.

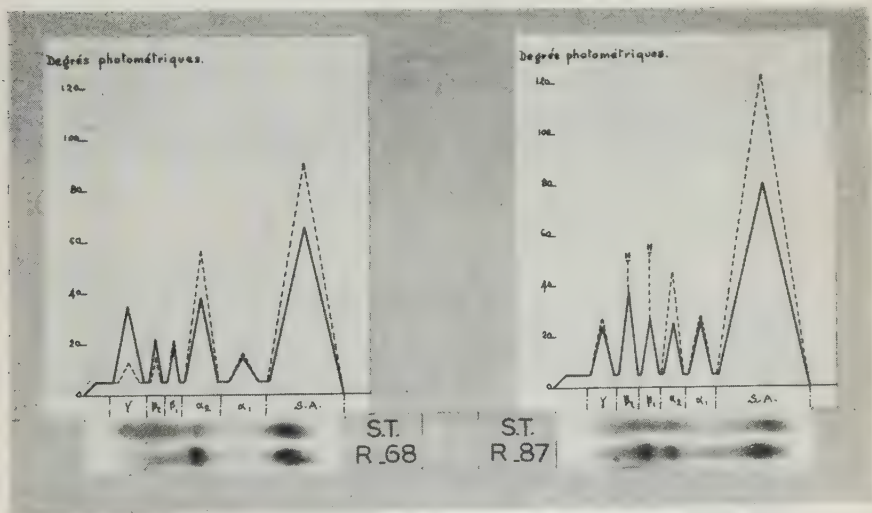


FIG. 6. — Rage canine.

Les traits pleins correspondent au sérum témoin, les traits pontillés au sérum pathologique. L'hémoglobine est marquée H. L'augmentation des globulines α_2 est nettement visible.

Et dans tous les cas, une augmentation des globulines γ et des sérum-albumines.

Cas RH.1. — Sérum prélevé lors de l'apparition de l'hydrophobie chez une femme de 40 ans, mordue au mollet par un chien, soixante jours auparavant.

Cas RH.2. — Sérum prélevé trois jours avant la mort d'un adolescent de 18 ans, mordu à l'avant-bras par un chien, quarante jours avant l'apparition de l'hydrophobie.

Cas RH.3. — Sérum prélevé six jours avant la mort, chez un policier de 26 ans, présentant les signes d'une rage furieuse.

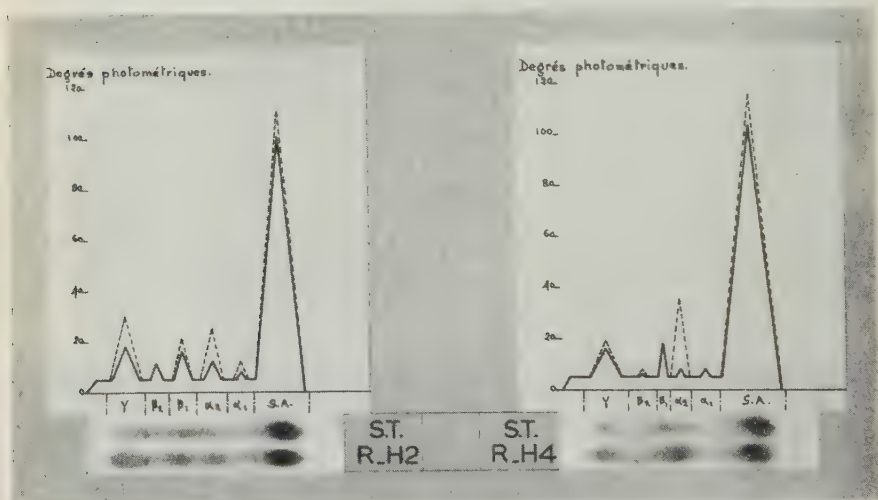


FIG. 7. — Rage humaine.
Mêmes remarques que pour la fig. 6.

Un chien enragé l'avait mordu profondément au mollet centquatre-vingt-cinq jours avant.

Cas RH.4. — Sérum prélevé la veille de la mort chez une jeune fille de 18 ans, atteinte de rage furieuse. Un chien suspect l'avait mordu à la cheville six mois et demi auparavant.

C. — INTÉRÊT DE LA TECHNIQUE ÉLECTROPHORÉTIQUE (3).

1° PRÉCOCITÉ. — Cette technique permet au laboratoire de porter un diagnostic de rage, du vivant de l'animal. En effet, l'augmentation des globulines a_2 est souvent antérieure à l'apparition des corps de Negri; elle est antérieure ou contemporaine des premières manifestations cliniques de la rage.

(3) Se reporter au tableau final pour comparer précocité, sensibilité et spécificité des différentes méthodes de diagnostic.

Cette précocité relative est mise en évidence dans les 8 observations suivantes :

A.11. — Rage expérimentale à virus des rues : l'augmentation des globulines α_2 est notée dix jours avant la mort et six jours avant l'apparition des premiers signes cliniques.

R.66. — Rage des rues naturelle : figure 8. Modifications électrophorétiques du sérum quatre jours avant la mort.

R. 27, R.41, R.83, R.85, R.90 et R.93. — Augmentation des globulines α_2 alors que l'examen histologique reste négatif.

D'une façon générale, les signes électrophorétiques apparaissent avant la période d'état de l'affection, s'accroissent

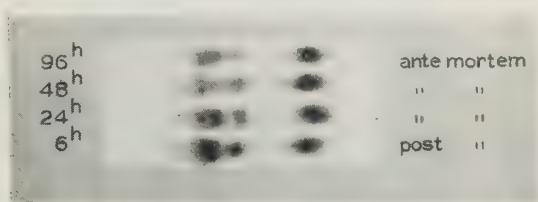


FIG. 8. — Chien R.66.

Noter l'augmentation progressive des globulines α_2 et l'importance croissante de l'hémoglobine au niveau des globulines β .

à l'agonie et sont décelables après la mort tant que l'hémolyse n'est pas trop importante. Ils persistent longtemps — quinze jours — dans les sérums malgré leur altération.

2° SENSIBILITÉ. — Les tracés électrophorétiques ont donné trente-trois fois une réponse franche sur 37 sérums examinés.

Dans 6 cas (R.27, R.41, R.83, R.85, R.90 et R.93), où les corps de Negri n'ont pu être mis en évidence, l'électrophorèse a permis un diagnostic de rage que les inoculations expérimentales devaient confirmer tardivement.

Cette méthode a précisé dix fois un diagnostic de rage du vivant des animaux (R.27, R.35, R.38, R.44, R.47, R.52, R.85, R.92, R.101 et R.102) et dépisté quatre fois la rage (R.41, R.50, R.58 et R.93), sur des sérums provenant de cadavres apportés au laboratoire.

Par contre, la lecture des tracés s'est montrée peu convaincante dans deux cas où l'existence de la rage a, cependant, été confirmée par les épreuves biologiques.

Il s'agissait de chiens suspects abattus dans la ville et dont nous avons recolté les sérums dans des conditions défavorables (R.67 et R.84).

A ces réponses que nous avons préféré considérer comme douteuses, nous opposons les deux observations suivantes :

R.27. — Ane, cliniquement suspect de rage, mort accidentellement et pour lequel l'histologie s'est révélée négative. L'électrophorèse du sang prélevé sur le cadavre permettait de soupçonner

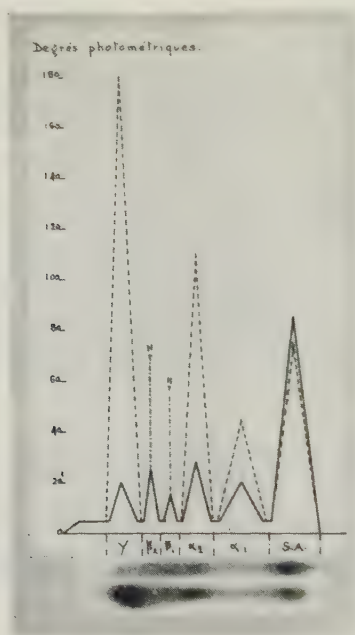


FIG. 9. — Chien R.83.

La bande met en évidence une très importante augmentation des globulines γ . L'augmentation appréciable des globulines β correspond à la présence d'hémoglobine dans le sérum (marquée H sur la figure). Noter l'importance de l'augmentation des globulines α_2 .

la rage. Quinze jours plus tard, l'épreuve biologique confirmait ce diagnostic.

R.83 (fig. 9). — Chien en hyperthermie ($41^{\circ}4$ C), qui meurt d'une pneumonie en vingt-quatre heures (autopsie et bacille de Fiedländer isolé du poumon). L'électrophorèse de contrôle décèle, parmi d'importantes altérations sériques, une nette augmentation des globulines α_2 permettant de soupçonner la rage. L'analyse histologique est négative. Douze jours plus tard, on obtenait une réponse positive des animaux inoculés.

3° SPÉCIFICITÉ. — Jusqu'à présent 33 diagnostics électro-

phorétiques de rage portés tant sur l'âne et la vache que sur le chien, ont été trente et une fois confirmés par les épreuves biologiques de contrôle et l'évolution de la maladie.

Les trente-deuxième et trente-troisième cas sont ceux des chiens R.75 et R.100 qui présentaient des signes de suspicion de rage et dont les sérums montraient une augmentation typique des globulines α_2 . Cependant les animaux ont survécu (4).

Par contre, chez le chat, sur 4 diagnostics électrophorétiques positifs, deux, à ce jour, ne sont pas vérifiés par les épreuves expérimentales.

Chat R.79. — Sérum prélevé dix-huit heures après la mort, montrant un accroissement notable des globulines α_2 . L'histologie est négative. Au quatre-vingtième jour, survie des animaux inoculés.

Chat R.94. — Sérum prélevé sur le cadavre. On observe une nette augmentation des globulines α_2 . Présence de nombreux corps de Negri. Au quarantième jour, survie des animaux inoculés.

En attendant que d'autres expériences puissent expliquer ces résultats divergents, nous considérerons que les réponses données par l'électrophorèse doivent être « réservées » en ce qui concerne cette espèce animale.

C'est surtout chez le chien que nous avons recherché si certaines affections ne pouvaient pas entraîner des modifications sériques superposables à celles rencontrées dans la rage.

Nous avons déjà observé que les maladies parasitaires ou d'origine microbienne provoquaient des surcharges dans la zone des globulines γ , mais sans altérer sensiblement les globulines α_2 .

Les maladies virales neurotropes dont certaines formes peuvent, sur le plan clinique, prêter à confusion avec la rage, méritaient des investigations poussées.

Nous n'avons pas pu réunir le matériel nécessaire à l'étude de la maladie de Carré (5), rare en Ethiopie.

Par contre, la maladie d'Aujeszky nous a fourni l'élément principal de cette recherche.

Sur les tracés et les représentations graphiques de 22 chiens inoculés,

(4) Ces animaux, maintenus en observation, font l'objet d'un travail en cours.

(5) L'unique sérum que nous avons manipulé montrait une importante augmentation des globulines β , un léger accroissement des globulines α_2 , une diminution des sérum-albumines.

Ce sérum nous a été expédié de France grâce à l'obligeance de M. le professeur Darraspen, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Nous l'en remercions vivement.

16 avec le virus 845 L (6) [fig. 10],
6 avec le virus Shangai 704 D (6),
nous avons constamment remarqué :

- une augmentation importante des globulines β_1 ;
- une augmentation des globulines α_2 ;
- une légère augmentation des sérum-albumines.

Ainsi pouvons-nous admettre que l'accroissement des globu-

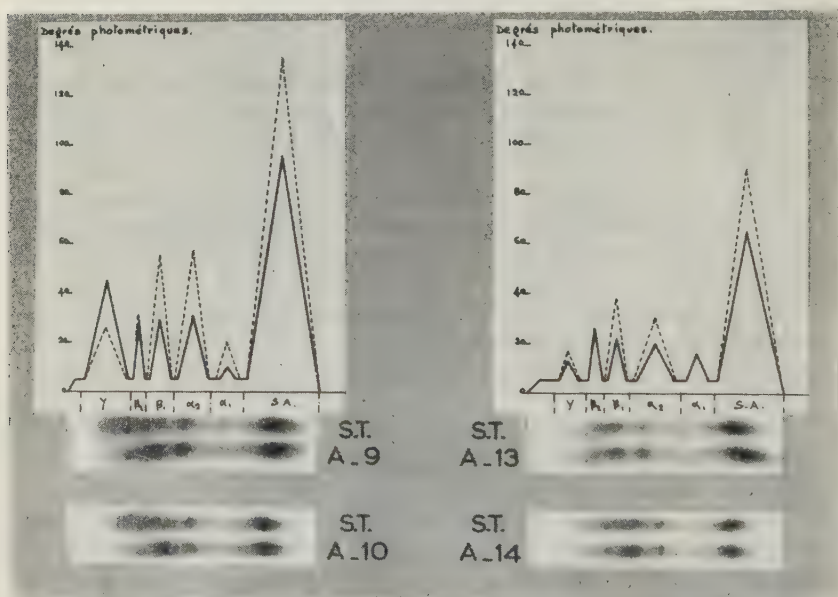


FIG. 10. — Sérums de chiens atteints de la maladie d'Aujeszky.

Les sérums A.9, A.10, A.13, A.14 ont pour témoin le sérum des mêmes animaux avant l'inoculation. Le sérum A.9 étant hémolysé, son témoin a été amené au même degré photométrique de lyse. Dans ces conditions, la fraction titrée au niveau des globulines β_1 , tant pour le sérum A.9 que pour son témoin, correspond aux globulines β_1 proprement dites, auxquelles s'ajoute l'hémoglobine.

lines β_1 représente le critère du diagnostic différentiel entre la maladie d'Aujeszky et la rage.

Nous citerons encore l'observation d'un chien présentant un prurit caudal à évolution heureuse, évoquant une maladie d'Aujeszky et dont le sérum montrait à l'électrophorèse des globulines augmentées en γ , β_2 , β_1 , mais sans modification des globulines α_2 .

(6) Ces souches proviennent de la collection de M. le professeur Lépine, de l'Institut Pasteur à Paris ; qu'il trouve ici nos remerciements.

Résultats obtenus avec les différentes méthodes de laboratoire.

Animal N°	Diagnostic clinique	Diagnostic histologique	Diagnostic biologique Incub. Mm sur cobayes	Diagnostic électro- phorétique	Prise de sang
Chien R.72	s.m.	+	7 jours	i.s.c.	Sur cadavre
Chien R.75	S	-	vivants	+	Sur cadavre
Chien R.78	s.m.	-	vivants	-	Sur cadavre
Chat R.79	s.m.	-	vivants	+	Sur cadavre
Chien R.83	-	+	8 jours	+	A.M. 4j
Chien R.84	s.m.s.	+	II jours	+	Sur cadavre
Chien R.85	S	-	21 jours	+	A.M. 24h
Chien R.87	+	+	18 jours	+	A.M. 8h
Mouton E88	S	+	II jours	+	A.M. 2h
Chien R.90	+	-	II jours	+	A.M. 3j
Chien R.92	S	-	12 jours	+	A le mort
Chien R.93	s.m.	+	21 jours	+	Sur cadavre
Chat R.94	s.m.	+	vivants	+	Sur cadavre
Chien R.99	S	-	vivants	-	Sur cadavre
Chien E100	S	+	10 jours	+	Sur cadavre
Chien E101	S	+	7 jours	+	Sur cadavre
Chien E102	S	+	7 jours	+	Sur cadavre

Animal N°	Diagnostic clinique	Diagnostic histologique	Diagnostic biologique Incub. Mm sur lapins	Diagnostic électro- phorétique	Prise de sang
Chien R.26	+	+	16 jours	+	A.M. 1h
Ans R.27	S	-	23 jours	+	P.M. 1h
Chien R.30	+	+	26 jours	+	A.M. 3b
Chien R.35	S	+	19 jours	+	A le mort
Veche R.38	S	+	16 jours	+	A.M. 24h
Chien R.40	+	+	18 jours	+	A.M. 6h
Chien R.41	s.m.	-	28 jours	+	Sur cadavre
Chien R.42	+	+	16 jours	+	A.M. 4h
Chien R.44	S	+	23 jours	+	A.M. 6h
Veche R.47	S	+	14 jours	+	A.M. 36h
Chien R.49	+	+	17 jours	+	A.M. 48h
Chien R.50	s.m.	+	15 jours	+	Sur cadavre
Chien R.52	S	+	15 jours	+	Sur cadavre
Chien R.53	+	+	17 jours	+	A.M. 12h
Chien R.54	+	+	19 jours	+	A.M. 24h
Chien R.58	s.m.	+	20 jours	+	Sur cadavre
Chien R.62	s.m.	-	vivants	-	Sur cadavre
Chien R.63	+	+	21 jours	+	A.M. 8h
Chien R.64	s.m.	+	17 jours	i.s.c.	P.M. 36h
Chien R.66	+	+	22 jours	+	A.M. 4j
Chien R.67	s.m.s.	+	15 jours	+	Sur cadavre
Chien R.68	+	+	26 jours	+	A.M. 6h

S = Suspect
 A.M. = Ante mortem
 P.M. = Post mortem
 s.m. = Apporté mort
 i.s.c. = Apporté mort après abattage
 i.s.c. = Affaiblissement, sang corrompu

Enfin, nous avons reconnu que ni les vaccinations (vaccin préventif animal, type Fermi), ni les traitements prolongés (vaccin humain, type Fermi) ne provoquaient l'augmentation des globulines α_2 chez le chien.

Par contre, l'homme en fin de traitement antirabique présente parfois des globulines α_2 légèrement augmentées.

RÉSUMÉ.

1° Au cours d'une même opération, la microélectrophorèse sur papier permet de comparer entre elles les différentes fractions d'un sérum suspect et de son témoin.

Le sérum témoin doit appartenir à la même espèce animale.

2° Dans ces conditions, l'électrophorèse montre que la maladie rabique entraîne des modifications sériques surtout apparentes dans la zone des globulines α_2 qui sont nettement augmentées.

3° Ces caractères se retrouvent chez le chien, le cheval, l'âne, la vache et le chat.

4° La technique électrophorétique procure du vivant des animaux et notamment du chien, des résultats plus précis que la technique histologique.

5° Jusqu'à ce jour, sa spécificité n'a jamais péché par défaut dans la rage du chien.

Cependant deux chiens ont survécu alors qu'ils présentaient une électrophorèse positive et des signes de suspicion de rage.

Enfin, sur 4 diagnostics électrophorétiques positifs chez le chat, 2 n'ont pas été confirmés par les épreuves biologiques.

CONCLUSION.

1° Lorsque le tracé électrophorétique d'un sérum montre une augmentation des globulines α_2 par rapport à celles de son témoin, il est légitime de soupçonner la rage.

2° L'électrophorèse offre suffisamment de garanties pour permettre au laboratoire de diagnostiquer la rage du vivant de certains animaux, notamment du chien.

★★

Nous remercions Mr. Gentile, assistant, Ato Abraha Debesai, technicien, de leur collaboration dévouée, ainsi que tous les travailleurs des Services Vétérinaires et de Ramassage des Chiens errants sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à bien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GANZIN et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 32.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES

A L'INSTITUT PASTEUR DE SAIGON, DE 1891 A 1954

par H. ARNOULT (*)

(Institut Pasteur de Saigon.)

HISTORIQUE.

En 1890, Albert Calmette fut chargé par Pasteur de fonder en Indochine le premier laboratoire de Microbiologie humaine. Il avait prévu l'organisation éventuelle d'un Service Antirabique et s'était, à son départ de France, muni de plusieurs cerveaux de lapins inoculés avec le virus fixe Pasteur.

A cette époque, l'existence même de la rage en Cochinchine était discutée, quoique la maladie fût très répandue dans les territoires voisins (presqu'île malaise, Indes Néerlandaises).

La population autochtone connaissait bien « la maladie des chiens fous » et savait que la morsure des animaux qui en étaient atteints pouvait être mortelle. Beaucoup de médecins et de vétérinaires pensaient qu'il s'agissait d'une maladie autre que la rage.

En raison des difficultés de communication et des incertitudes du diagnostic, la rage humaine était rarement observée à Saigon en 1890.

A peine débarqué, A. Calmette commence son enquête.

Un cas de rage humaine avait été signalé en 1870 par Lallueaux d'Ornay. Puis le silence était retombé et l'on ne parlait plus de la maladie quand, en 1887 et en 1888, deux Européens moururent avec des symptômes de rage à l'hôpital de Saigon.

En Annam, Sibaud signale à Calmette un cas de rage chez un missionnaire ; Paul Gouzien observe au Tonkin trois cas de rage humaine chez des légionnaires et deux cas chez des autochtones. En même temps, de nombreuses observations cliniques étaient recueillies ou retrouvées dans les archives médicales de la colonie, et tendaient à démontrer que les victimes de la rage étaient, proportionnellement à la population, au moins aussi nombreuses en Indochine qu'en France.

(*) Manuscrit reçu le 20 octobre 1954.

La conviction de Calmette était faite mais, avant de commencer les vaccinations antirabiques, il était nécessaire de convaincre ceux qui doutaient encore de l'identité de la « maladie des chiens fous » avec la rage. L'occasion ne se fit pas attendre. Le 5 avril 1891, un chien amené deux jours auparavant à Calmette par M. Duchêne, vétérinaire militaire, mourut avec les symptômes cliniques de la rage furieuse. Un fragment de bulbe fut inoculé, devant témoins, à deux lapins par trépanation. Les deux animaux furent pris de rage, l'un le treizième jour, l'autre le dix-septième jour ; le bulbe du premier fut inoculé à deux lapins neufs qui contractèrent la rage à leur tour. Deux chiens, mordus par le premier et qui avaient été mis en observation, moururent également de rage confirmée.

MÉTHODES DE TRAITEMENT.

I. MÉTHODE PASTORIENNE DES MOELLES DESSÉCHÉES. — Devant de tels faits, le doute n'était plus possible et, conformément au désir du Conseil Supérieur de Santé des Colonies, un service antirabique régulier fut organisé à Saigon. Il fonctionna à partir du 15 avril 1891, appliquant au traitement des mordus la méthode pastorienne qui venait de faire ses preuves à Paris.

Cette méthode utilisait un virus fixe, d'origine canine, adapté au lapin par une série ininterrompue de passages d'animal à animal.

L'atténuation du virus rabique avait été obtenue par Pasteur en plaçant les moelles de lapins infectés dans des flacons à deux tubulures dont le fond était garni de potasse.

Conservées dans une chambre obscure à température assez basse (10-12°) et fixe, ces moelles se déshydrataient lentement sous l'action du courant d'air et de la potasse.

Il était donc possible, en pratiquant des inoculations et des démoellations quotidiennes, d'entretenir au laboratoire une série complète de moelles desséchées d'âges différents échelonnés entre deux et douze jours. Mais cette technique entraînait une consommation élevée de lapins, et exigeait des locaux importants. Aussi Calmette, qui ne disposait que de maigres crédits et d'une installation sommaire, dut-il la modifier en y introduisant un perfectionnement adopté depuis par les Instituts du monde entier. Il s'agit de l'immersion en glycérine dont Roux avait démontré les propriétés conservatrices vis-à-vis du virus rabique. Calmette, à son tour, prouva expérimentalement que les moelles desséchées, plongées dans un flacon de glycérine stérile, gardaient à la glacière pendant quinze jours le degré d'atténuation qu'elles avaient atteint au moment de l'immersion.

« En présence de ces résultats, écrit Calmette, je me suis cru

autorisé à compter sur ce procédé de conservation des moelles, au cas où des individus mordus se présenteraient, pour me tenir prêt à pratiquer des vaccinations sans avoir besoin d'entretenir journellement des passages de virus de lapin à lapin. Toutefois, je me fis une règle de rejeter les moelles restées plus de quatorze jours dans la glycérine ».

C'est ainsi que fut créée à Saigon cette méthode de conservation des moelles dans la glycérine qui a joui d'une réputation universelle, justifiée par ses résultats parfaits et par les économies qu'elle permet de réaliser, qualités précieuses qui l'ont fait adopter par la plupart des Institut antirabiques.

Cette méthode fut appliquée à Saigon de 1891 à 1948, avec les légères modifications de détail que ses expériences à l'Institut Pasteur de Lille ont amené Calmette à y apporter.

Tant à cause de la profondeur des morsures des malades que du long temps écoulé avant leur arrivée à Saigon, Calmette institua, au début, des traitements intensifs calculés de telle sorte que les moelles virulentes de huit à douze jours étaient injectées pendant quatorze jours en trois séries complètes répétées.

Dans la suite, deux modalités de traitement furent adoptées selon le siège et la gravité des morsures, comportant vingt-cinq jours ou vingt et un jours d'inoculation, conformément aux formules suivantes A et B.

	FORMULE A			FORMULE B		
	10-9 jours, 8-7 jours			10-9 jours, 8-7 jours		
1 ^{er} jour : moelles de. . . .	10-9	jours,	8-7 jours	10-9	jours,	8-7 jours
2 ^e — : —	6-5	—	4-3 —	6-5	—	4-3 —
3 ^e — : —			3-2			3-2
4 ^e — : —			2			7
5 ^e — : —			7			7
6 ^e — : —			6			6
7 ^e — : —			5			5
8 ^e — : —			4			4
9 ^e — : —			3			3
10 ^e — : —			2			2
11 ^e — : —			7			7
12 ^e — : —			6			6
13 ^e — : —			5			5
14 ^e — : —			4			4
15 ^e — : —			3			3
16 ^e — : —			2			2
17 ^e — : —			4			4
18 ^e — : —			3			3
19 ^e — : —			2			2
20 ^e — : —			4			3
21 ^e — : —			3			2
22 ^e — : —			2			
23 ^e — : —			3			
24 ^e — : —			2			
25 ^e — : —			2			

Ces traitements donnèrent pendant trente-quatre ans des résultats constamment favorables, mais ils avaient l'inconvénient d'être longs.

A partir de 1925, les moelles desséchées de deux à six jours furent seules utilisées et leur séjour en glycérine ne dépassa pas dix jours.

Les formules C et D répondent aux deux cas les plus fréquents.

C				D			
—				—			
1 ^{er} jour :	moelles de . .	6-5 jours		1 ^{er} jour :	moelles de . .	6-5 jours	
2 ^o — :	— . .	4-3 —		2 ^o — :	— . .	4-3 —	
3 ^o — :	— . .	3-2 —		3 ^o — :	— . .	3-2 —	
4 ^o — :	— . .	6-5 —		4 ^o — :	— . .	6-5 —	
5 ^o — :	— . .	5-4 —		5 ^o — :	— . .	5-4 —	
6 ^o — :	— . .	4-3 —		6 ^o — :	— . .	4-3 —	
7 ^o — :	— . .	3-2 —		7 ^o — :	— . .	3-2 —	
8 ^o — :	— . .	4-3 —		8 ^o — :	— . .	4-3 —	
9 ^o — :	— . .	3-2 —		9 ^o — :	— . .	3-2 —	
10 ^o — :	— . .	4-3 —		10 ^o — :	— . .	4-3 —	
11 ^o — :	— . .	3-2 —		11 ^o — :	— . .	3-2 —	
12 ^o — :	— . .	4-3 —		12 ^o — :	— . .	4-3 —	
13 ^o — :	— . .	3-2 —		13 ^o — :	— . .	3-2 —	
14 ^o — :	— . .	4-3 —		14 ^o — :	— . .	4-3 —	
15 ^o — :	— . .	3-2 —		15 ^o — :	— . .	3-2 —	
				16 ^o — :	— . .	4-3 —	
				17 ^o — :	— . .	3-2 —	
				18 ^o — :	— . .	2 —	

Soit 30 injections (15 cm de moelle)
pour les cas habituels.

Soit 35 injections (17 cm de moelle)
après morsures graves.

La quantité de substance immunisante joue aussi un rôle important ; elle oscille, dans les divers Instituts, entre 110 et 150 mm de moelle. Le traitement de l'Institut Pasteur de Saigon utilisait 15 cm de moelle dans les cas habituels, 17 cm dans les cas graves. Les résultats obtenus par cette méthode ont été aussi favorables qu'avec les formules précédentes.

Cependant, en cas de morsures multiples et profondes, en cas de morsures de la face, ou lorsque la victime se présentait tardivement, éventualité particulièrement fréquente à l'Institut Pasteur de Saigon à cette époque, on admettait qu'il y avait intérêt à inoculer, dès les premiers jours, des moelles sûrement virulentes et à augmenter le plus possible les quantités de virus, de façon à hâter le développement de l'immunité.

Les deux formules suivantes ont été adoptées pour des cas exceptionnels :

1° Formule E :

1 ^{er} jour : moelles de	6-5 jours, 4-3 jours	} 2 injections matin et soir.
2° — : —	3-2 — 2-2 —	
3° — : —	3-2 — 2-2 —	
4° — : —	5-4 —	
5° — : —	4-3 —	
6° — : —	3-2 —	
7° — : —	4-3 —	
8° — : —	3-2 —	
9° — : —	4-3 —	
10° — : —	3-2 —	
11° — : —	4-3 —	
12° — : —	3-2 —	
13° — : —	4-3 —	
14° — : —	3-2 —	
15° — : —	4-3 —	
16° — : —	3-2 —	
17° — : —	4-3 —	
18° — : —	3-2 —	

2° Formule F utilisée dans les cas de morsures profondes de la face :

1 ^{er} jour : moelles de	6-5 jours, 4-5 jours, 3-2 jours
2° — : —	5-4 — 4-3 — 3-2 —
3° — : —	4-3 — 3-2 — 2-2 —
4° — : —	3-2 — 2-2 — 2-1 —
2 injections trois fois par jour (8 h.; 11 h.; 16 h.).	
5° — : —	2-1 — 1-0 —
6° — : —	4-3 — 3-2 —
7° — : —	3-2 — 2-1 —
8° — : —	1-0 — 4-3 —
9° — : —	3-2 — 1-0 —
10° — : —	2-1 — 1-0 —
2 injections deux fois par jour (8 et 16 h.).	

Pendant plus d'un demi-siècle (1891-1948) la vaccination pastorienne au moyen des moelles desséchées, perfectionnée par Calmette et utilisée à Saigon selon les méthodes exposées ci-dessus, a rendu d'incomparables services. Il nous semble qu'il était intéressant d'en signaler dans cette rétrospective, et avec quelques détails, les différentes modalités d'application dans un pays où la rage est fréquente et particulièrement grave (pendant les vingt dernières années, le pourcentage des animaux mis en observation et reconnus enragés a varié de 33,3 à 67, ce qui témoigne bien de l'importance de l'enzootie rabique à Saigon).

II. MÉTHODE DU VACCIN ANTIRABIQUE PHÉNIQUÉ. — C'est en 1938, que commença l'étude expérimentale du vaccin antirabique phéniqué. On essaya d'abord la méthode de Fermi (vaccin phéniqué

atténué), puis la méthode de Semple (vaccin phéniqué tué). Les résultats obtenus furent très bons et comparables à ceux que donnait la méthode pastorienne. L'application de vaccin phéniqué à l'homme ne se fit qu'en 1945, date à partir de laquelle l'Institut Pasteur de Saigon vaccina une partie des sujets mordus avec le vaccin phéniqué et expédia ce même vaccin dans les différents postes d'Indochine (remplaçant ainsi l'I.P. de Hanoï dont l'activité avait été réduite du fait des événements politiques).

Pendant deux ans et demi, les deux méthodes furent simultanément utilisées à Saigon pour le traitement des personnes mordues. Enfin, le 1^{er} janvier 1948, le vaccin atténué par dessiccation fut abandonné au profit du vaccin phéniqué tué dont la préparation est plus économique, plus souple, et dont l'emploi est plus simple. Cette nouvelle méthode a permis de décentraliser au maximum les vaccinations antirabiques tout en centralisant la production du vaccin.

Depuis le mois d'août 1952 nous avons remplacé le lapin par la chèvre (à défaut du mouton, rare dans le Sud Viet-Nam), dans le but d'éviter le « choc lapinique » (Remlinger). Depuis cette substitution il n'a été observé à Saigon ni choc, ni accident paralytique et les érythèmes locaux sont apparus de moindre importance. Il est juste toutefois de dire que la méthode des injections dispersées appliquée dans notre Institut par Seys avant cette substitution lapin-chèvre avait procuré les mêmes avantages.

Virus utilisé. — Le virus fixe apporté par A. Calmette en 1891 avait subi 273 passages lors de son arrivée à Saigon. A cette époque, il paralysait le lapin inoculé par voie intracérébrale au septième ou huitième jour et le tuait en onze à douze jours.

Au 1^{er} janvier 1925, le même virus était à son mille cinq cent dix-huitième passage, la période d'incubation chez le lapin n'était plus que de six jours et l'évolution totale de la maladie ne dépassait pas dix jours.

Depuis 1935, l'incubation du virus s'est réduite à quatre jours ou quatre jours et demi et l'évolution de la maladie rabique ne dépasse pas six jours. A la fin de l'année 1953, le virus était à son trois mille quatre-vingt-deuxième passage et présentait les mêmes caractéristiques d'incubation et d'évolution chez le lapin qu'en 1935.

Le virus fixe Saigon a toujours été entretenu sur l'encéphale de lapin. Les appareils à froid modernes dont nous disposons nous ont permis de réduire le nombre des passages. Actuellement nous faisons un passage par mois et conservons des cerveaux-souches en glycérine à — 20°.

Nous venons de faire en 1953 l'expertise complète du virus fixe à son 3 080^e passage.

Cette étude fera l'objet d'une publication spéciale.

Renseignements généraux concernant les consultants et les personnes traitées. — Il serait fastidieux de fournir ici les statistiques détaillées qui figurent dans les différents rapports annuels de l'Institut Pasteur de Saigon, mais il est cependant intéressant de donner quelques renseignements généraux.

Parmi les consultants nous avons en général 1 Européen pour 10 Asiatiques; le sexe masculin fournit 60 p. 100 des sujets traités.

La répartition par âge est la suivante :

0 à 5 ans.	10	p. 100
5 à 15 ans.	37,5	p. 100
15 à 25 ans.	19	p. 100
25 à 40 ans.	20,5	p. 100
Plus de 40 ans.	13	p. 100

On constate que les enfants et les adolescents sont les plus fréquemment mordus.

L'animal mordeur le plus répandu est de loin le chien (80 à 90 p. 100 des cas), puis viennent le chat, le rat, le singe et le cheval qui à eux tous ne représentent que 10 à 20 p. 100 des animaux mordeurs.

Si l'on classe les sujets mordus en tenant compte du nombre des morsures on constate que, dans plus de la moitié des cas, il y a de deux à cinq morsures et que les morsures multiples ne concernent que 10 p. 100 des cas.

Les morsures sont superficielles dans 60 p. 100 des cas et profondes dans 30 p. 100 des cas; le reste est constitué par de simples éraflures.

L'étude de la répartition des traitements basée sur le siège des morsures nous apprend que les membres inférieurs sont touchés dans plus de la moitié des cas; les membres supérieurs, le tronc et enfin la tête ne sont atteints que dans 30 à 40 p. 100 des cas.

Dans les statistiques concernant la rage, il est classique de répartir les morsures suivant que les vêtements ont été ou non interposés. Cette distinction est un peu artificielle à Saigon du fait de la minceur des tissus vestimentaires; notons cependant que les trois quarts des sujets sont mordus sur peau nue.

A Saigon, 80 p. 100 des sujets mordus sont mis en traitement dans les quatre jours qui suivent la morsure, 2 p. 100 seulement sont vus après plus de vingt et un jours.

Classification d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur:

<i>Animaux appartenant à la catégorie A :</i>		
Rage confirmée au laboratoire	10 à 15	p. 100
<i>Animaux appartenant à la catégorie B :</i>		
Rage constatée cliniquement	1 à 3	p. 100
<i>Animaux appartenant à la catégorie C :</i>		
Simple suspicion de rage	80 à 90	p. 100
<i>Animaux appartenant à la catégorie D :</i>		
Absence de rage	0,5	p. 100

La majorité des consultants sont mordus par des chiens non identifiés.

ACTIVITÉ DU SERVICE ANTIRABIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR
DE SAIGON DEPUIS SA CRÉATION (15 AVRIL 1891)
JUSQU'AU 31 DÉCEMBRE 1953.

Nous avons recherché dans les archives du service les renseignements permettant d'établir le tableau I (le nombre des personnes traitées indiqué correspond à celui des personnes ayant reçu un traitement complet).

La lecture de ce tableau révèle que de 1891 à 1902, l'activité du service fut minime (moins de 100 personnes traitées dans l'année). De 1903 à 1916, ce nombre a varié entre 100 à 200 par année. De 1917 à 1944, on assiste à une augmentation massive très nette allant jusqu'à 2 411 traitements en 1937.

En 1945, se produisit une chute brutale, conséquence immédiate des événements militaires et politiques (exode de la population et destruction massive des chiens). Cette chute se maintint deux ans mais, très rapidement, le nombre des personnes traitées augmenta pour atteindre en 1953 le chiffre record de 2 539 traitements.

RÉSULTATS DES VACCINATIONS ANTIRABIKES. — De 1891 à 1953, le Service antirabique de Saigon a traité 52 751 personnes et n'a eu à déplorer au total que 44 faux échecs du traitement (rage survenue pendant le traitement ou moins de quinze jours après la fin du traitement) et 47 échecs vrais (rage survenue plus de quinze jours après la fin du traitement). Seule cette catégorie d'échecs doit être portée au passif de la vaccination.

La mortalité s'est abaissée régulièrement depuis 1892 où elle atteignait 5 p. 100. Depuis 1906, elle est au-dessous de 1 p. 100 et elle est pratiquement nulle depuis quinze ans comme l'indique le tableau I.

Au total le pourcentage global de mortalité, en soixante-deux ans, est seulement de 0,089.

ACCIDENTS DU TRAITEMENT ANTIRABIQUE. — De 1891 à 1953, sur un total de plus de 52 000 personnes soumises au traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Saigon, il a été constaté neuf accidents paralytiques dont deux eurent une évolution mortelle et sept guérirent rapidement. Cette proportion d'accidents paralytiques est faible, d'autant plus que dans plusieurs cas, l'imprégnation éthylique semble avoir joué un rôle favorisant dans l'apparition des accidents.

A côté des accidents paralytiques on note, aussi bien avec les moelles desséchées qu'avec le vaccin phéniqué, des accidents sans

TABLEAU I. -- Traitements complets faits à l'I. P. de Saigon de 1891 à 1953.

ANNÉES	NOMBRE DE PERSONNES ayant reçu un traitement complet	MORTS SURVENUES pendant le traitement ou moins de 15 jours après le traitement antirabique	MORTS SURVENUES plus de 15 jours après la fin du traitement		TOTAL DES DÉCÈS
			nombre	p. 100	
1891. . .	26	0	1	3,9	1
1892. . .	59	0	3	5,0	3
1893. . .	68	0	1	1,4	1
1894. . .	62	0	2	3,2	2
1895. . .	55	0	1	1,8	1
1896. . .	57	0	2	3,5	2
1897. . .	63	0	1	1,5	1
1898. . .	53	0	1	1,8	1
1899. . .	54	0	1	1,8	1
1900. . .	77	0	0	0	0
1901. . .	48	0	0	0	0
1902. . .	67	0	0	0	0
1903. . .	120	0	3	2,5	3
1904. . .	110	0	0	0	0
1905. . .	94	1	0	1	1
1906. . .	107	6	0	0	6
1907. . .	86	0	0	0	0
1908. . .	123	0	1	0,81	1
1909. . .	137	0	1	0,73	1
1910. . .	102	0	0	0	0
1911. . .	129	0	1	0,77	1
1912. . .	104	0	0	0	0
1913. . .	117	0	1	0,85	1
1914. . .	105	0	0	0	0
1915. . .	148	0	0	0	0
1916. . .	105	0	0	0	0
1917. . .	203	0	1	0,49	1
1918. . .	268	0	1	0,37	1
1919. . .	402	2	2	0,49	4
1920. . .	375	2	0	0	2
1921. . .	452	2	2	0,44	4
1922. . .	561	1	0	0	1
1923. . .	689	1	0	0	1
1924. . .	668	1	2	0,29	3
1925. . .	1 112	0	2	0,18	2
1926. . .	1 001	3	0	0	3
1927. . .	1 024	4	0	0	4
1928. . .	1 273	0	0	0	0
1929. . .	1 364	3	4	0,29	7
1930. . .	1 328	0	3	0,22	3
1931. . .	1 338	0	1	0,074	1
1932. . .	1 591	2	2	0,13	4
1933. . .	1 896	4	1	0,05	5
1934. . .	1 944	3	1	0,05	4
1935. . .	2 250	2	1	0,04	3
1936. . .	2 197	1	0	0	1
1937. . .	2 411	1	1	0,04	2
1938. . .	2 233	3	0	0	3
1939. . .	2 371	1	2	0,08	3
1940. . .	2 238	1	0	0	1
1941. . .	2 050	1	0	0	1

ANNÉES	NOMBRE DE PERSONNES ayant reçu un traitement complet	MORTS SURVENUES pendant le traitement ou moins de 15 jours après le traitement antirabique	MORTS SURVENUES plus de 45 jours après la fin du traitement		TOTAL DES DÉCÈS
			nombre	p. 100	
1942. . .	4 920	1	0	0	1
1943. . .	2 121	0	0	0	0
1944. . .	1 494	0	0	0	0
1945. . .	561	—	—	—	—
1946. . .	624	1	0	0	1
1947. . .	889	1	0	0	1
1948. . .	1 046	2	0	0	2
1949. . .	1 272	0	0	0	0
1950. . .	1 379	0	1	0,07	1
1951. . .	1 381	0	0	0	0
1952. . .	2 010	0	0	0	0
1953. . .	2 539	0	0	0	0
Total .	52 751	44	47	0,089	91

gravité tels que des érythèmes locaux aux points d'injection ; prurigineux et fugaces, ils apparaissent du sixième au dixième jour et disparaissent avant la fin du traitement.

Avec les moelles desséchées, quelques très rares abcès locaux furent observés. Le vaccin phéniqué préparé avec l'encéphale de lapin fut responsable du « choc lapinique », plus spectaculaire que dangereux, mais cependant fort désagréable pour la personne traitée et pour le personnel du service. Ce choc a totalement disparu depuis que nous utilisons la chèvre.

Cas de rage humaine. — Il nous faut maintenant parler des cas de rage humaine que les médecins du service ont été amenés à connaître. Les individus atteints de rage n'ont pas tous été vus à l'Institut Pasteur et les chiffres que nous rapportons sont largement inférieurs à la réalité. Les archives ne nous ont pas permis de faire un relevé complet depuis 1891. Aussi nous limitons-nous à des renseignements portant sur les six dernières années.

En 1948 : 2 cas, en 1949 : 1 cas, en 1950 : 4 cas, en 1951 : 2 cas, en 1952 : 1 cas et en 1953 : 8 cas : soit au total 18 cas en six ans. Tous ces cas concernent des Asiatiques qui sont arrivés à la consultation en état de rage. Les observations des malades figurent dans les rapports annuels de l'Institut Pasteur de Saigon.

Le temps qui s'est écoulé entre la morsure et l'apparition des premiers symptômes de rage a varié entre quarante-cinq et quatre-vingt-dix jours.

L'évolution de la maladie ne dépassa généralement pas trois

jours. Pour la plupart, il s'agissait de personnes peu grièvement mordues, qui n'avaient pas suivi le traitement, soit par ignorance, soit par négligence.

Les morsures étaient parfois si minimes qu'il fut impossible de les localiser. On nous a signalé à deux reprises que le chien mordeur était très jeune.

Ces malheureux furent soumis à divers traitements qui ne modifièrent pratiquement pas l'évolution de la maladie. Il semble cependant que la méthode « d'hibernation artificielle » ait rendu moins pénibles les derniers moments de ces malades.

CONCLUSIONS.

L'Institut Pasteur de Saigon assure depuis plus d'un demi-siècle les traitements antirabiques (plus de 50 000 personnes). Les résultats obtenus sont excellents et le nombre d'échecs à déplorer diminue régulièrement; la mortalité globale n'est que 0,089 p. 100.

La méthode de moelles desséchées fut la seule pratiquée de 1891 à 1945. Le vaccin phéniqué tué l'a progressivement remplacée depuis 1945 et est le seul utilisé depuis 1948.

Depuis huit ans, le service antirabique de l'Institut Pasteur de Saigon est le centre producteur pour les Etats Associés du Cambodge, du Laos et du Viet-Nam. Il exporte en outre du vaccin phéniqué en dehors des Etats Associés.

La décentralisation des traitements antirabiques a été poussée au maximum et permet, malgré toutes les difficultés actuelles, de traiter les sujets mordus sans qu'il soit besoin de les évacuer sur un service antirabique (évacuation qui serait souvent très difficile, sinon impossible).

Depuis 1952, la chèvre a remplacé le lapin et nous avons vu, comme partout ailleurs, disparaître les incidents occasionnés par l'encéphale du lapin.

La rage est enzootique parmi les très nombreux chiens errants de Saigon-Cholon. La population, actuellement bien avertie du danger que constituent pour elle ces animaux, se présente avec empressement à la consultation antirabique. L'action bienfaisante du Service antirabique devrait être complétée par une décanisation intensive de la capitale du Viet-Nam.

**RECHERCHES SUR LES TITRES D'ANTICORPS
(RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT)
SIGNIFICATIFS EN FRANCE D'UNE INFECTION RÉCENTE
DUE AUX VIRUS DE LA GRIPPE, DES OREILLONS
ET DU GROUPE ORNITHOSE-PSITTACOSE (*).**

par M. PEILLARD, R. SOHIER et J. GINESTE (**) (***).

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

Si l'on tient compte de la fréquence avec laquelle les infections à virus provoquent des infections inapparentes ou des manifestations morbides ne permettant pas de reconnaître cliniquement l'intervention de ces microorganismes, on comprend l'intérêt tant diagnostique qu'épidémiologique des recherches ayant pour objet de les identifier en décelant les anticorps qui ont pu les faire apparaître.

On sait tout ce qu'ont apporté les enquêtes sérologiques effectuées dans ce but pour l'étude des modalités de transmission et de diffusion de plusieurs infections à virus. Mais ces investigations systématiques peuvent aussi fournir des données des plus utiles pour l'interprétation des résultats des réactions sérologiques employées à des fins diagnostiques. Si la meilleure méthode consiste à comparer le taux des anticorps présents dans deux sérums, l'un dit « précoce » prélevé très près du début de la maladie, l'autre dit « tardif » prélevé au décours de celle-ci, et à considérer comme significative d'une infection récente l'apparition dans le deuxième échantillon d'anticorps absents dans le premier ou une différence nette du titre d'anticorps dans l'un et l'autre prélèvement, tous ceux qui ont la charge d'effectuer au laboratoire le diagnostic biologique des maladies à virus savent combien il est difficile d'obtenir des médecins que les prises de sang soient faites en temps voulu. Et d'ailleurs même

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 décembre 1954.

(**) Travail effectué grâce à une subvention de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale attribuée par l'Institut National d'Hygiène (Directeur : professeur L. Bugnard).

(***) Avec la collaboration technique de J. Freydier.

lorsque les cliniciens s'efforcent de fournir ce premier prélèvement, il arrive, en raison de l'entrée tardive du malade, ou de certaines hésitations diagnostiques, qu'il soit effectué trop tard par rapport au début de l'infection.

Devant les obstacles rencontrés pour réaliser cette étude comparée de deux sérums, doit-on admettre que le diagnostic au laboratoire est impossible, ou tenter d'obtenir des indications valables pour l'analyse d'un seul sérum dit « tardif » ? On ne peut espérer apporter des données utilisables que si l'on connaît, d'une part les titres rencontrés dans le sérum de convalescents de la maladie que l'on se propose d'identifier, et d'autre part ceux décelés dans le sang d'un nombre suffisant de sujets considérés comme sains, du moins au moment du prélèvement, et vivant autant que possible dans la même région ou le même pays et dans des conditions matérielles à peu près semblables.

Nous avons procédé à un certain nombre de recherches concernant trois infections à virus dont le diagnostic peut être fait par la réaction de fixation du complément.

MÉTHODES.

Pour l'ornithose et les oreillons, a été mise en œuvre la méthode type Kolmer que nous avons décrite (1) et modifiée pour réaliser non plus une semi-micro-méthode, mais une micro-méthode en tubes ; les volumes intervenant sont les suivants comptés en gouttes d'une pipette donnant L gouttes au millilitre : sérum à expertiser, I goutte ; antigène, deux unités dans I goutte ; complément 2 unités dans II gouttes ; eau physiologique, I goutte dans tous les témoins ; système hémolytique, II gouttes d'hématies sensibilisées à 2 unités. Fixation à 0 — 4° pendant dix-huit heures. La réaction est lue deux fois, la première immédiatement après la constatation d'hémolyse totale dans les témoins et la seconde une demi-heure après la mise au bain-marie à 37°, soit dans les mêmes conditions que le titrage. Toute fixation du complément entraînant l'absence totale d'hémolyse en ne permettant que 0 à 25 p. 100 au maximum d'hémolyse après trente minutes était considérée comme positive.

Pour la grippe, nous avons employé la méthode décrite par Hoyle : fixation à 37° pendant une heure, modifiée quant aux volumes intervenant dans la réaction pour obtenir une micro-méthode en tubes, soit au comple-gouttes donnant L gouttes au millilitre : sérum à expertiser I goutte ; complément, 2 unités dans I goutte ; eau physiologique, I goutte ; hématies sensibilisées à 4 unités, II gouttes. Lecture après trente minutes à 37°.

(1) Pour les détails techniques et en particulier ceux concernant la préparation des antigènes, on voudra bien se reporter au livre récent de P. Lépine et R. Sohier, *Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des infections à virus*, Masson, édit., Paris, 1954.

MATÉRIEL.

Les sérums peuvent être groupés en deux lots, ceux de malades cliniquement typiques et ceux des sujets dits « témoins » (2) obtenus par prélèvement de sang à des adolescents de 18 à 25 ans. Comme nous nous proposons de définir les titres maxima d'anticorps présents dans le sérum de sujets considérés comme non atteints récemment de la maladie pour laquelle nous cherchions à fixer les taux significatifs d'une infection évolutive ou ayant cessé depuis peu, notre choix s'est porté sur un groupe de population exposé à l'infection d'une part et ayant vécu dans différentes régions de France antérieurement à leur séjour à Lyon d'autre part [étudiants en médecine (3)]. Nous avons utilisé aussi pour certaines études les sérums prélevés chez des malades de différents services d'un hôpital, et dont l'affection pour laquelle ils étaient traités était connue de nous et sans rapport avec des infections à virus.

RÉSULTATS.

Nous nous limiterons à donner succinctement les résultats obtenus à ce jour, une étude plus détaillée devant être ultérieurement publiée.

ORNITHOSE-PSITTACOSE-LYMPHOGRANULOMATOSE. — L'antigène utilisé (1) était préparé à partir de poumon de souris selon une technique de Bedson modifiée par Dekking.

Sujets « témoins » : 306. Réaction de fixation du C' (4) : négatives, 292 ; positives à 1/8 : 9, à 1/16 : 4, à 1/32 : 1, à 1/64 : 0.

Malades : 15. Résultats de la réaction de fixation du C' en tenant compte des titres maxima atteints au cours ou au décours de l'infection : négative, 0 ; positives à 1/16 : 4, à 1/32 : 3, à 1/64 : 4, à 1/128 : 3, à 1/512 : 1.

Les pourcentages de réactions négatives et positives obtenus chez les sujets témoins et chez les malades sont indiqués dans la figure 1.

On constatera que 73,2 p. 100 des sérums de malades donnent des réactions positives pour des dilutions égales ou supérieures à 1/32 et que 26,6 p. 100 seulement n'atteignent que le titre 1/16. Mais pour les sérums des sujets témoins, on ne trouve

(2) Ces « témoins » seraient sans doute mieux désignés par le terme de « tout-venant ».

(3) Il s'agissait d'étudiants en médecine de l'Ecole du Service de Santé militaire venant lors de leur entrée dans cet établissement de toutes les régions de France. Les prélèvements de sang effectués pour la détermination des groupes sanguins ont été utilisés pour cette étude.

(4) Lire désormais pour fixation du C' : fixation du complément.

que 1,3 p. 100 de sérums donnant une réaction positive à cette dilution.

On pourrait donc admettre que tout sérum donnant une réaction positive à 1/32 peut être considéré comme provenant très vraisemblablement d'un sujet ayant été infecté récemment par un virus du groupe ornithose-psittacose-lymphogranulomatose. Si la réaction est positive au 1/16, il y a une grande probabilité pour que le patient ait subi une atteinte récente.

GRIPPE. — Il ne sera question que des résultats concernant le virus A, ou plus exactement les réactions de fixation du complé-

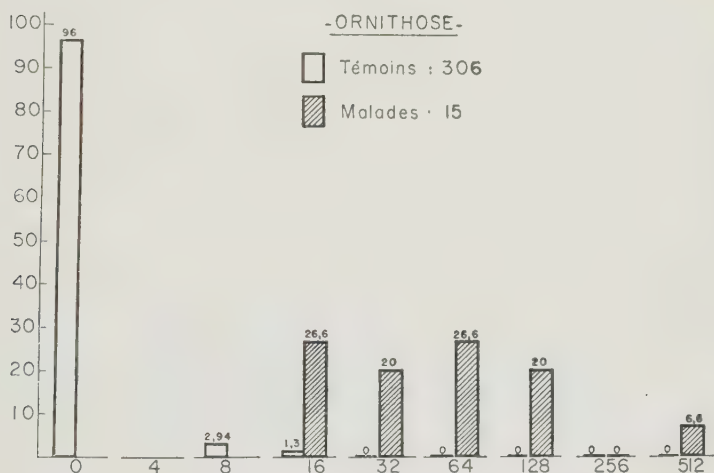


FIG. 1.

ment effectuées selon la méthode de Hoyle avec l'antigène préparé avec une souche remise par Hoyle pour celui obtenu sur poumon de souris, et avec la souche PR 8 pour celui préparé sur œuf embryonné. Nous pouvions ainsi déceler, comme nous l'avons vérifié, tant par isolement du virus que par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, les anticorps chez les sujets atteints de grippe à virus A et à virus dit FM 1 ou A'.

Sujets « témoins ». — 187. Réaction de fixation du C' : négatives, 182 ; positives, à 1/8, 4 ; à 1/16, 1 ; à 1/32, 0 ; à 1/64, 0.

Malades (5). — 129. Résultats de la réaction de fixation du C'

(5) Il s'agissait pour la plupart des cas de malades observés au cours d'une épidémie survenue en 1952-1953, mais il y a aussi quelques cas sporadiques ; chez tous ces malades on avait noté une augmentation significative des taux des anticorps.

en tenant compte des titres maxima atteints au cours ou au décours de la grippe : négative, 0 ; positives, à 1/8, 10 ; à 1/16, 17 ; à 1/32, 30 ; à 1/64, 23 ; à 1/128, 27 ; à 1/256, 15 ; à 1/512, 6 ; à 1/1024, 1.

Les pourcentages des réactions négatives et positives obtenues chez les témoins et chez les malades sont indiqués dans la figure 2.

Il apparaîtra que 79 p. 100 des grippés ont, dans leur sérum, au moins une fois, un titre d'anticorps tel que leur sérum donne

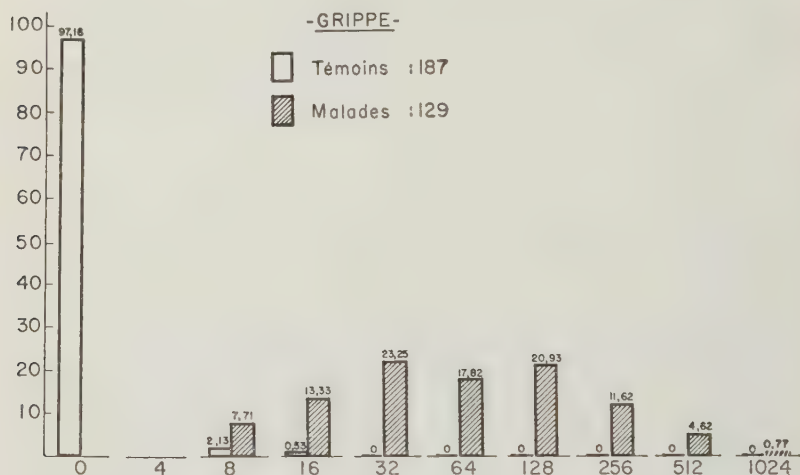


FIG. 2.

une réaction positive pour la dilution à 1/32 ou plus. Il y en a 13 p. 100 seulement qui n'atteignent que le titre 1/16 et 7,7 p. 100 le titre 1/8.

A l'opposé, pour les sérums des sujets dits « témoins » on ne note que 0,5 p. 100 de réactions positives à 1/16 et 2,13 p. 100 à 1/8.

On pourrait donc admettre qu'une réaction de fixation du C' positive à 1/32 peut être considérée comme prouvant une infection grippale récente, alors que les positivités pour les dilutions de 1/16 indiquent une probabilité, celles de 1/8 ne pouvant être interprétées.

OREILLONS. — L'antigène utilisé était du liquide allantoïque d'œufs inoculés avec la souche BOS isolée dans notre laboratoire.

Nous avons cru devoir distinguer quatre groupes de sujets : témoins ; exposés à l'infection ; atteinte ourlienne prouvée par

l'existence d'une parotidite transmissible ou par des localisations caractéristiques de la maladie ; parotidite avec ou sans atteintes considérées comme de nature ourlienne, mais sans notion de contagé.

Témoins. — 157. Il s'agit de sujets tout-venant, originaires de la campagne ou de la ville, âgés pour la plupart de 18 à 25 ans. Nous avons trouvé : Réactions de fixation du C' négatives, 115 ; positives, à 1/8, 24 ; à 1/16, 12 ; à 1/32, 2 ; à 1/64, 4 ; à 1/128, 0.

Malades. — 62. Nous ne retiendrons dans ce groupe que les manifestations morbides pouvant être considérées comme dues

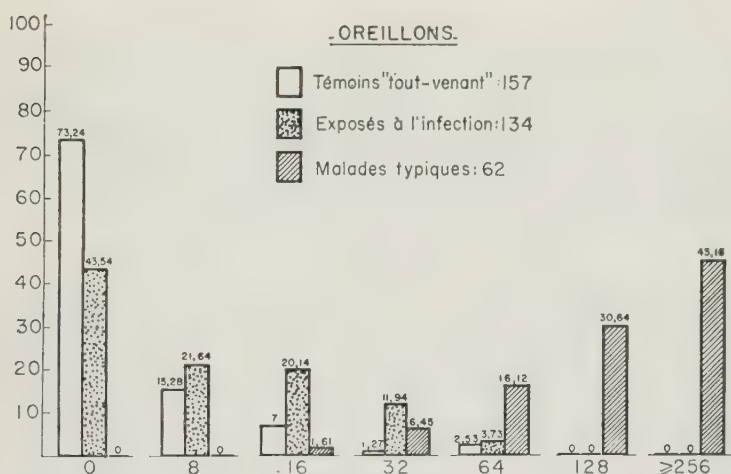


FIG. 3.

au virus des oreillons, parce qu'il s'agissait de parotidites, épidémiques ou non, mais pour lesquelles on avait la notion de contagé et dont certaines s'accompagnaient d'orchite ou de méningite lymphocytaire. Sur 62 malades de ce type, nous avons compté : Réaction négative, 0 ; réactions positives, à 1/8, 0 ; à 1/16, 1 ; à 1/32, 4 ; à 1/64, 10 ; à 1/128, 19 ; à 1/256, 28.

Parotidites sporadiques d'étiologie imprécise. — Les sujets de cette catégorie avaient une parotidite aiguë. On ne retrouvait pas de contagé et pour certains, on notait une localisation testiculaire ou méningée. Les résultats ont été les suivants. Parotidite ou sous-maxillite isolée 2 cas : l'un positif à 1/512, l'autre à 1/1024. Parotidite et orchite : 1 cas positif à 1/128. Parotidite et méningite : 2 cas, les deux positifs à 1/256. Parotidite, orchite et méningite lymphocytaire : 1 cas, négatif.

Ainsi, on constate (voir fig. 3) que les sujets témoins n'attei-

gnent le titre de 1/64 que dans 2,53 p. 100 des cas, et que parmi ceux pouvant être exposés à l'infection, on trouve le titre de 1/64 pour 3,73 p. 100 d'entre eux.

Les malades atteints d'une infection due au virus ourlien ont un sérum fixant le C' dans 75,7 p. 100 des cas à 1/128 et au-dessus.

On peut donc dire que la constatation d'une réaction de fixation du C' positive à 1/128 et au-dessus peut être considérée comme significative d'une infection récente et que, pour le titre de 1/64, il y a une forte probabilité pour qu'il en soit de même, avec quelques réserves si le sujet a pu être exposé à l'infection antérieurement.

Le groupe des manifestations morbides sans notion de contagé mérite une place à part. Un cas curieux a retenu notre attention, celui du sujet atteint de parotidite avec orchite et réaction méningée lymphocytaire, sans hyperalbuminorachie. La réaction de fixation du C', effectuée trois fois, dont la dernière au vingtième jour après le début, a été négative. Peut-être, aurait-on pu déceler plus tardivement une augmentation du taux des anticorps ?

DISCUSSION.

Il paraît possible d'indiquer pour les trois infections étudiées des titres de positivité de la réaction de fixation du complément traduisant une infection récente par le virus pour lequel on a cherché à déceler dans le sérum des anticorps spécifiques. Nous ne saurions prétendre que l'on peut affirmer l'existence de cette infection, mais seulement montrer que, compte tenu des observations faites chez un nombre suffisant de sujets vivant dans les mêmes conditions, le titre indiqué doit apporter au clinicien une indication très utile. Il existe une zone « frontière », le 1/32 pour le groupe ornithose-psittacose-lymphogranulomatose et la grippe, le 1/64 pour les oreillons, pour laquelle on peut admettre une forte probabilité d'infection récente.

Il est bien entendu que ces chiffres ne sont valables que pour notre pays et dans la mesure où la réaction mise en œuvre est du type de celle que nous avons employée et faisant intervenir des antigènes identiques ou similaires. Toutes nos réactions étaient d'ailleurs constamment contrôlées par la mise en jeu de quatre sérums de référence dont deux humains et deux animaux, positifs et négatifs, de façon à pouvoir comparer tous les résultats entre eux.

Il est un problème qui doit être résolu, celui du rôle possible des réinfections sur le titre des anticorps. On peut concevoir en effet qu'un sujet ayant été antérieurement infecté de façon apparente ou occulte et exposé récemment à une réinfection puisse fournir un sérum dont la teneur en anticorps soit augmentée de

façon passagère. En ce cas, le titre trouvé indiquerait une réinfection récente et non une infection, et la maladie en cause pourrait ne pas avoir de rapport avec cette modification du titre des anticorps. Il faudrait aussi rechercher si une infection due à un virus ou une bactérie, mais sans rapport avec celle-ci, ne peut pas, dans certaines circonstances, augmenter transitoirement (comme cela a été vu pour les microorganismes figurés) la teneur en anticorps du sérum.

RÉSUMÉ.

La confrontation des résultats des réactions de fixation du complément effectuées, d'une part chez des sujets considérés comme témoins, d'autre part chez des malades atteints de formes dûment identifiées d'infections dues au virus du groupe ornithosepsittacose, de la grippe et des oreillons, permet d'établir des titres d'anticorps qui peuvent être considérés comme significatifs en France d'une infection récente par un de ces trois virus. Il existe aussi des titres « frontière » indiquant qu'il y a une forte probabilité pour que ces virus soient en cause.

Mais ces données n'ont aucune valeur absolue et, tout en apportant éventuellement d'utiles indications au clinicien ou à l'épidémiologiste, elles doivent être interprétées en fonction des données cliniques et des anamnestiques.

Elles ne sont valables que si la technique adoptée et si l'interprétation des résultats sont les mêmes. Enfin, il est possible que dans un autre pays et en fonction des conditions épidémiologiques différentes, elles n'aient pas la même signification.

ÉTUDES SUR LES BACTÉRIES LIGNINOLYTIQUES

(PREMIER MÉMOIRE)

par M. RAYNAUD, B. BIZZINI, G. FISCHER et A. R. PRÉVOT (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

I. — INTRODUCTION. GÉNÉRALITÉS. MÉTHODES.

L'existence des bactéries ligninolytiques a été longtemps discutée. Divers auteurs, parmi lesquels nous citerons Pringsheim et Fuchs [1], Bach [2], Balks [3], Falck [4], Demme [5], Phillips, Weihe et Smith [6], Fahreus et coll [7, 8, 9], Cartwright et Findlay [10], avaient bien rapporté que certaines bactéries étaient capables d'attaquer la lignine. Mais la mesure de la dégradation de la lignine était souvent critiquable, consistant uniquement dans la baisse de teneur en méthoxyle. L'attention s'était surtout fixé sur certains champignons dont les propriétés ligninolytiques sont bien connues. Ces travaux sur les champignons ont permis de préciser les techniques d'étude de la ligninolyse. Grâce à eux et aux progrès réalisés dans la chimie de la lignine on dispose de méthodes permettant de préparer, à partir du bois, diverses formes de lignines plus ou moins solubles et de les titrer.

Dans les rares cas où la ligninolyse a été contrôlée par des techniques rigoureuses, les bactéries actives n'ont fait l'objet d'aucune description. Ainsi en est-il du *Bacterium* n° 5 mentionné par Waksman et Hutchings [12]. Si bien que, dans leur revue générale de 1951, Gottlieb et Pelczar [13] pouvaient écrire : « Thus far, no specific or identified bacterial species has been reliably associated with the natural degradation of lignin ».

L'existence de bactéries ligninolytiques ne pouvait donc être considérée comme établie avant le travail récent de Fischer [14]. Ce dernier a précisé les conditions d'isolement de ces bactéries. Il a montré que ces germes ne se rencontrent que très exceptionnellement sur les bois en décomposition, mais qu'on les trouve par contre en abondance dans le sol des forêts. Certains d'entre nous avaient trouvé indépendamment qu'il était très difficile d'isoler des bactéries des bois en décomposition. Sur plus de 1 000 isollements à partir de ce matériel, nous n'avions pu isoler que deux souches attaquant la lignine. Le travail de Fischer

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 décembre 1954.

établissait sans conteste l'existence de bactéries ligninolytiques. Mais leur place dans la systématique restait mal définie, si bien que leur rôle réel dans la nature restait à préciser. Le Dr Fischer ayant accepté de venir participer aux recherches que nous effectuons dans ce domaine, nous avons pu isoler très rapidement à partir de sources très diverses un grand nombre de souches ligninolytiques. Nous les avons trouvées répandues dans les sols les plus variés. Cette large diffusion nous laissait déjà prévoir un rôle assez important dans la nature.

L'étude systématique de ces souches nous a montré qu'elles appartenaient au groupe *Pseudomonas*. Nous avons été ainsi conduits à rechercher l'activité de diverses espèces de *Pseudomonas* de la collection de l'Institut Pasteur qui se sont révélées pourvues d'une activité ligninolytique marquée.

On sait par ailleurs que de nombreux représentants de ce même groupe sont susceptibles d'attaquer des substances à noyau benzénique.

Evans [15, 16] a montré que cette attaque se faisait par voie oxydative et qu'elle passait par un acide cétonique intermédiaire que Kilby [17] a identifié comme étant l'acide β -céto-adipique.

Stanier, dans une série de publications [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28 a, 28 b, 28 c], a montré toute la complexité de ce processus dont il a précisé les stades principaux, grâce à l'application du principe de l'adaptation simultanée.

Stanier a eu l'amabilité de nous faire parvenir la souche de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* A-3-12), dont l'étude est incluse dans le présent travail.

Des bactéries d'autres groupes ont été décrites comme attaquant les substances aromatiques. Les souches étudiées par Gray et Thornton : *Mycobacterium crystallophagum*, *Micrococcus sphaeroides*, *Vibrio cuneata*, *Pseudomonas rathonis*, *Bacillus clostridioides* [29], n'ont malheureusement pas été conservées par la National Collection of Type Culture et nous n'avons pu les examiner.

Stanier nous a adressé par contre la souche de *Mycobacterium butyricum*, dont l'activité vis-à-vis des composés aromatiques a été établie par ailleurs [30] et que nous prendrons comme type de *Mycobacterium* saprophyte.

Nous nous sommes proposé le programme de travail suivant :

1° Préciser les méthodes permettant d'apprécier l'attaque de la lignine et d'isoler des bactéries ligninolytiques ;

2° Etablir la position dans la systématique des bactéries ligninolytiques isolées soit précédemment (souches de G. Fischer), soit récemment (souches Institut Pasteur, Garches) ;

3° Vérifier si toutes les bactéries décrites comme attaquant les substances aromatiques sont ligninolytiques ;

4° Rechercher si les enzymes permettant l'attaque de la lignine sont adaptatifs ou non dans ces diverses souches ;

5° Essayer, par l'application du principe de l'adaptation enzymatique simultanée, de fixer les voies de dégradation de la lignine, avec l'espoir d'apporter des données nouvelles sur la structure de ce composé naturel ;

6° Préciser le rôle dans la nature des *Pseudomonas*.

Si leur fonction primitive réside bien dans la ligninolyse, leur propriété d'attaquer les substances à noyau aromatique en dérive comme une conséquence du principe de l'adaptation simultanée.

Le présent travail a pour objet la description des méthodes générales d'étude que nous avons utilisées et rapporte les constatations préliminaires que nous avons faites.

A. — MÉTHODES ET TECHNIQUES.

1° *Préparation de la lignine*. — Matériel. Nous avons employé de la poudre de bois de sapin, de peuplier et de châtaignier.

La *phénol-lignine* a été préparée à partir de semoule de bois passée au tamis n° 100-120, suivant Kalb, Schœller et Mastaglio [31]. Des variations de détail dans la technique pouvant conduire à des préparations légèrement différentes, nous donnons pour toutes ces méthodes, le mode opératoire que nous avons utilisé.

Extraction du bois pendant vingt-quatre heures par le mélange benzène-alcool (1/1) au Soxhlet. On chauffe au bain-marie entre 95° et 100°, dans un ballon muni d'un réfrigérant, un mélange de 100 g de phénol anhydre et de 0,9 g de SO_4H_2 concentré. On ajoute au mélange fondu 5 à 8 g de bois traité comme ci-dessus. On maintient le tout pendant deux heures à 95°-100°. Après refroidissement, on additionne le contenu du ballon d'un peu d'acétone (50 ml environ) jusqu'à fluidification de la masse. On essore pour éliminer le résidu cellulosique qu'on lave à l'acétone. Le filtrat acétonique et l'acétone de lavage sont réunis. L'acétone est chassée par ébullition aussi complètement que possible. Le résidu est alors soumis à un entraînement à la vapeur surchauffée jusqu'à élimination totale du phénol. Du ballon encore chaud, on élimine l'eau de condensation et on lave le résidu de phénol-lignine d'abord plusieurs fois à l'eau chaude, puis à l'eau froide. La phénol-lignine se solidifie ; on la pulvérise au mortier. Elle est de nouveau lavée à l'eau chaude puis à l'eau froide. Après séchage à l'air, on obtient une poudre brun clair, très légère, soluble dans l'alcool, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol. Le rendement est de 10 à 20 p. 100 (du bois d'origine, poids sec).

Le produit peut être encore purifié par dissolution dans l'alcool et réprécipitation par l'eau. On répète trois fois cette opération.

Caractères :

1° Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (fig. 1) :

$$E^{1\text{ p. }100}_{277} = 160.$$

2° Teneur en méthoxyle : 15,35 p. 100.

3° N : 0,28 p. 100.

L'alcalilignine a été préparée suivant Beckman, Lieske et Lehman [32] à partir de la paille de blé coupée en fragments de 1 cm de long environ. La paille disposée dans une conserve de 2 l est recouverte d'une solution de NaOH à 2,5 p. 100. On abandonne à la température

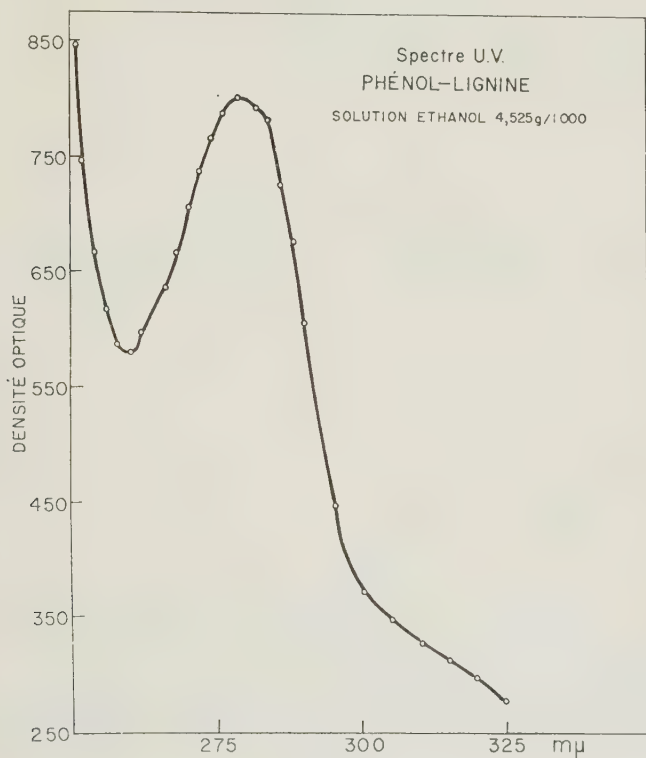


FIG. 1.

ambiante pendant quarante-huit heures. Pendant ce laps de temps, la paille est pressée à plusieurs reprises à l'aide d'une grille, de façon à ce qu'elle reste constamment recouverte par la solution alcaline. Après essorage, on précipite la lignine du filtrat par addition d'HCl à 25 p. 100, en quantité telle que l'on ait à la fin de l'opération une concentration en acide libre égale à 2-2,5 p. 100. On porte à l'ébullition pendant cinq à dix minutes. On filtre et lave jusqu'à disparition de la réaction des ions Cl^- . Le produit est mis en suspension dans l'eau et il est porté plusieurs fois à l'ébullition pour chasser l'HCl, en changeant plusieurs fois l'eau. Après séchage, on obtient une poudre brun foncé soluble dans l'alcool. Sa solubilité dans une solution diluée de

soude (N/10) peut être utilisée pour sa purification ultérieure, la lignine étant reprécipitée de sa solution alcaline par HCl.

Caractères :

1° Spectre d'absorption dans l'U. V. (fig. 2) :

$$E_{276}^{1\%} = 148.$$

Solution aqueuse saturée (concentration 16,7 mg/ml) ;

2° Teneur en méthoxyle : 14,2 p. 100 ;

3° N = 0,33 p. 100.

L'ammoniaque lignine est préparée dans les mêmes conditions en

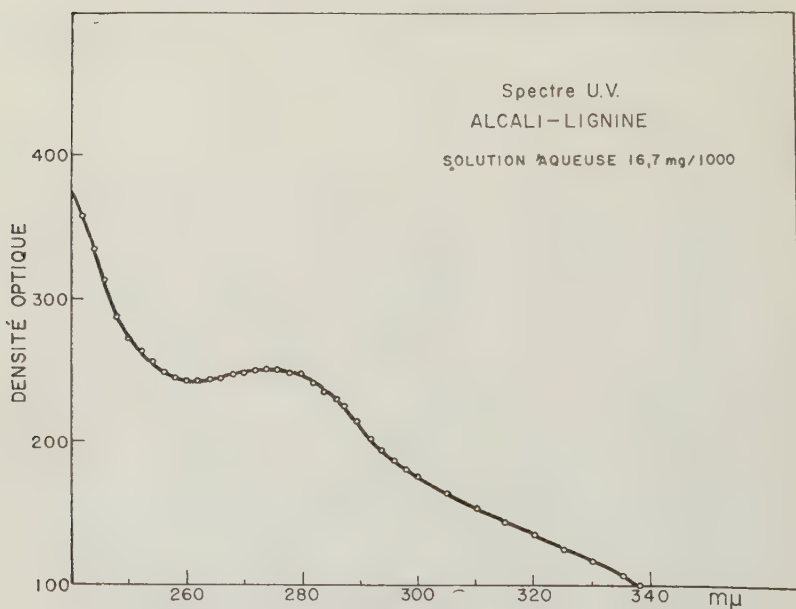


FIG. 2.

remplaçant la solution de NaOH par une solution de NH_4OH à 4 p. 100. Le produit obtenu se présente sous l'aspect d'une poudre brun foncé, soluble dans la pyridine et le phénol, légèrement soluble dans l'alcool. On peut le purifier par redissolution en ammoniaque diluée et reprécipitation par acidification.

Caractères :

1° Spectre d'absorption U. V. (fig. 3) :

$$E_{276}^{1\%} = 340.$$

Solution dans NH_4OH , N/10, ajustée à pH = 9 par addition d'HCl ;

2° N = 2,10 p. 100.

L'amyli lignine a été préparée, d'après Hägglund et Urban [33], à partir de semoule de bois de sapin, passée au tamis n° 40.

Extraction de vingt-quatre heures à reflux par le mélange benzène-alcool (1/1). On chauffe à reflux pendant deux heures un mélange de 10 g de bois, 100 g d'alcool isoamylique, 12,5 ml d'HCl à 37 p. 100. La solution alcoolique filtrée est lavée à l'eau par décantation pour enlever l'HCl et dissoudre les sucres, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est recueilli dans de la soude diluée. La solution est filtrée. Le filtrat brun clair est acidifié, ce qui entraîne la précipitation de l'amyli lignine. La purification est effectuée par redissolution dans l'acide acétique glacial et précipitation par addition d'eau dis-

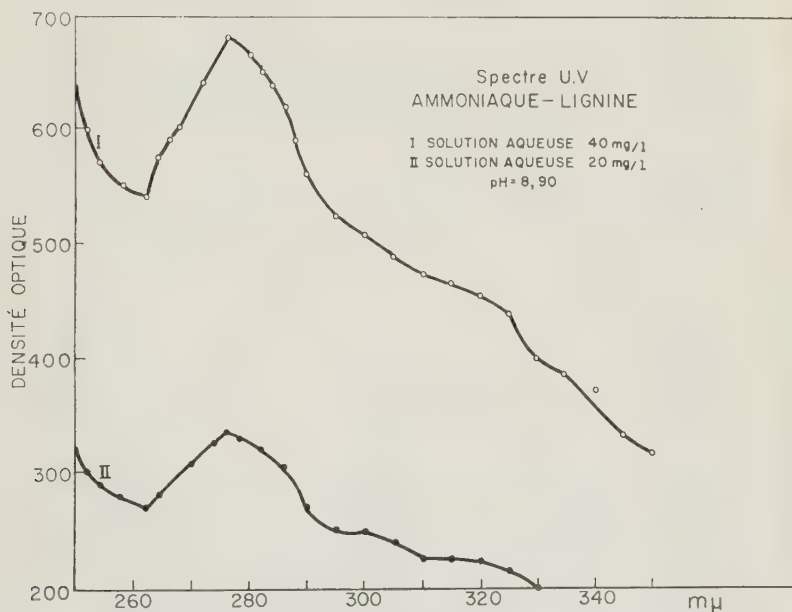


FIG. 3.

tillée. Après séchage, on obtient une poudre brun clair soluble dans l'alcool, l'acétone, l'acide acétique.

La lignine native a été préparée selon Brauns [34] à partir de semoule de bois de sapin passée au tamis n° 60-80. Le bois est soumis à une extraction par l'eau froide puis par l'éther à froid pendant quarante-huit heures. On extrait ensuite par l'alcool à la température ordinaire dans un percolateur jusqu'à ce que l'alcool sorte incolore. Cette opération dure dix jours environ. On concentre alors l'extrait alcoolique (pour 120 g de bois, nous avons obtenu 4 l d'extrait) en présence de CO_2Ca à température $\leq 40^\circ$. On chasse les dernières traces d'alcool par distillation sous vide après addition d'eau distillée. Il se produit ainsi une première précipitation de la lignine sous forme très fine-

ment divisée. Cette suspension aqueuse est séparée des produits résineux qui restent. Ces derniers sont lavés à l'eau puis à l'éther, ce qui conduit à la formation d'une masse poudreuse. On essore. On réunit les deux fractions et on sèche sur SO_4H_2 puis sur soude. On extrait le produit séché par l'éther anhydre au Soxhlet pendant quarante-huit heures. On dissout le résidu dans du dioxane anhydre purifié, de façon à obtenir une solution à 10 p. 100. On centrifuge et on élimine le résidu insoluble. La solution brun foncé est reprécipitée en la versant dans quinze fois son volume d'eau sous agitation vigou-

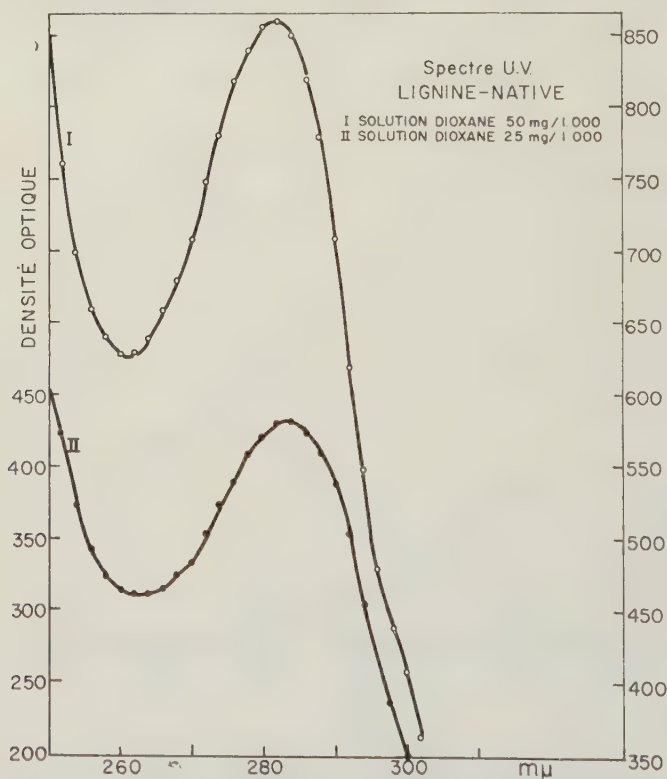


FIG. 4.

reuse. Il se forme une solution colloïdale que l'on coagule par addition de quelques grammes de SO_4Na_2 anhydre. On filtre, lave à l'eau et sèche.

Purification : On fait une solution à 10 p. 100 dans le dioxane anhydre. On verse lentement cette solution dans de l'éther anhydre en agitant violemment. La lignine qui précipite sous forme d'une poudre très fine est lavée à l'éther anhydre, à l'éther de pétrole, au benzène, et de nouveau à l'éther de pétrole à bas point d'ébullition.

Tous ces solvants sont employés anhydres. On sèche sur SO_4H_2 en présence de lamelles de paraffine. On répète cette opération trois fois. Le rendement final est très faible (1 p. 100).

La *lignine native* se présente sous forme d'une poudre couleur crème, soluble dans l'alcool méthylique, l'alcool éthylique, le dioxane, la pyridine et insoluble dans l'eau.

Caractères :

1° Spectre d'absorption dans l'U. V. (fig. 4) :

$$\frac{1}{E} \frac{p \cdot 100}{286} = 173.$$

2° Teneur en méthoxyle : 14,5 p. 100.

Les spectres U. V. de nos différentes préparations sont en bon accord avec ceux de la littérature, en particulier, avec ceux publiés par M^{me} Gunhild Aulin-Erdtman [35].

2° *Milieux de culture.* — a) Milieu synthétique (milieu A) (Waksman et Hutching [42]). Substrat : 2 p. 1 000 (phénol-lignine, ammoniacque-lignine, ligno-sulfonate de Ca, substance à noyau aromatique) :

$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	0,50 g
$\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	0,50 g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
FeCl_3	0,02 g
H_2O	q. s. p. 1 000 ml
pH = 6,8	

a) *Phénol-lignine* : On ajoute au milieu de culture la phénol-lignine en solution dans l'alcool. Le milieu est porté à l'ébullition jusqu'à élimination de l'alcool. La phénol-lignine forme dans ce milieu une émulsion homogène qui, même après stérilisation à l'autoclave, ne donne pas de dépôt appréciable. Il ne s'agit cependant pas d'une solution vraie, car on peut faire déposer la phénol-lignine par centrifugation à grande vitesse.

β) *Alcali-lignine et ammoniacque lignine* : Deux techniques ont été utilisées :

Ajouter directement l'ammoniacque-lignine en solution dans NH_4OH et neutraliser à pH = 7,0 par HCl N/10 avant stérilisation. On obtient un milieu *clair*, coloré en jaune.

Dissoudre l'ammoniacque-lignine dans l'alcool et opérer comme pour la phénol-lignine. On obtient après évaporation de l'alcool une suspension homogène.

L'intérêt de cette technique tient au fait suivant : alors que la solution claire d'alcali-lignine est attaquée avec une faible consommation d' O_2 au Warburg, la suspension obtenue par évaporation de la solution alcoolique en présence d'eau est attaquée avec

une consommation élevée d'oxygène par les suspensions microbiennes.

γ) L'amy-lignine a été dissoute dans l'alcool amylique, l'isobutyl lignine dans l'alcool isobutylique.

On ajoute au milieu de culture la solution de lignine dans son solvant particulier que l'on élimine par ébullition. On obtient ainsi une suspension aqueuse homogène. L'état physico-chimique de la suspension aqueuse joue un rôle important dans l'attaque par les suspensions bactériennes.

La lignine native a été utilisée de deux façons différentes :

Soit en suspension aqueuse directe : une certaine quantité de lignine est mise en suspension dans l'eau et cette suspension est ajoutée au milieu de culture ;

Soit suivant la même technique que pour la phénol-lignine. Une solution de lignine dans le dioxane est ajoutée au milieu et le dioxane est chassé par ébullition. La suspension homogène ainsi obtenue est attaquée beaucoup plus activement au Warburg.

b) Milieu pour la recherche du caractère adaptatif : milieu de Stanier [36] (milieu n° 1 Stanier).

Solution minérale

NO_3NH_4	0,1	p. 100
$\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	0,1	p. 100
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	p. 100

La source de carbone est ajoutée à la concentration de 0,1 p. 100.

Pour les milieux ordinaires, nous avons employé l'asparagine.

3° Détermination de la lignine résiduelle après culture :

a) Phénol-lignine : technique de Waksman et Hutchings [42].

b) Ammoniaque-lignine : on précipite la lignine résiduelle par acidification par HCl concentré en excès. Le précipité est lavé à l'eau, plusieurs fois séché et pesé.

c) Alkali-lignine : titrage par spectrophotométrie directe à 276 mμ.

Les mesures de consommation d'oxygène en présence de divers substrats par les suspensions bactériennes ont été faites par la méthode conventionnelle de Warburg. Les cupules centrales contenaient, sauf indication contraire, 0,2 ml de KOH à 10 p. 100 ; volume total, 2,2 ml. Les résultats sont rapportés en général sous forme de courbes donnant, en fonction du temps, la quantité d'oxygène (exprimée en microlitres) consommée par milligramme d'azote bactérien de la suspension bactérienne employée. La consommation propre des bactéries en l'absence de substrat n'est pas déduite mais reportée sur les courbes sous la dénomination de « respiration endogène ». Nous donnons aussi dans certains

tableaux le $QO_2(N)$ [millimètres cubes d'oxygène consommés par heure et par milligramme d'azote microbien]. Dans ce cas, la consommation propre des bactéries en l'absence de substrat a été déduite.

SOUCHES ÉTUDIÉES. — Les souches étudiées ont diverses origines :

1° *Souches de G. Fischer.* — Ces souches sont numérotées de I à XX et le chiffre de la souche est suivi d'une lettre B ou F qui indique l'origine de l'isolement B, sol de forêt de bouleau (Buchenwald) ; F, sol de forêt de pin (Fichtenwald).

Ces souches isolées en 1951-1953 avaient été conservées depuis en collection. Lors de leur repiquage, certaines d'entre elles n'ont pas repoussé, si bien que leur étude complète n'a pu être faite. Nous n'avons étudié en détail, pour cette raison, que les souches suivantes : II B, III B, IV B, V B, VI F.

2° *Souches isolées à l'Institut Pasteur* (1953-1954). — Ces souches sont numérotées de 20 à 40 et T. Leur origine est indiquée dans le deuxième mémoire.

3° *Souches de la Collection de l'Institut Pasteur :*

Pseudomonas aeruginosa Vallon,

Pseudomonas aeruginosa A-22,

Pseudomonas aeruginosa E-F,

Pseudomonas fluorescens putidum,

Pseudomonas stutzeri,

Pseudomonas tabaci,

Mycobacterium de Grassberger,

Mycobacterium tuberculosis, variété BCG.

Les dénominations employées, qui ne correspondent pas toutes à la dénomination internationale, sont celles de la Collection de l'Institut Pasteur (où l'on peut facilement se les procurer).

4° *Souches transmises par le Dr Stanier :*

Pseudomonas A-3-12,

Mycobacterium butyricum.

Préparation des suspensions microbiennes fraîches. — Les germes ont été obtenus soit par culture sur milieu solide, soit par culture agitée en milieu liquide.

Sur milieux solides ordinaires (gélose nutritive), nous avons utilisé des cultures de dix-huit heures à 25°.

Sur milieu Stanier I à l'asparagine, solidifié, nous avons employé des cultures de vingt-quatre à quarante-huit heures.

Sur milieu synthétique gélosé à la lignine, la croissance est très lente et nous avons dû utiliser des cultures âgées de 10 jours.

En milieu liquide, nous avons presque toujours employé des cultures agitées réalisées en ballon de Fernbach ou en gros tube de 200 ml. L'agitation est réalisée, soit par un mouvement

de bascule (15 à 120 oscillations par minute), soit par un mouvement de va-et-vient (60 mouvements par minute).

L'azote total des suspensions a été déterminé par la méthode de Kjeldahl et par détermination de la densité optique au photomètre de Klett-Summerson avec l'écran 540.

<i>Pseudomonas T</i>	$\delta = 1\ 000$	N = 3,04 mg/ml
<i>Pseudomonas A-3-12</i>	$\delta = 1\ 000$	N = 2,86 mg/ml

Technique d'isolement. — Le matériel de départ est représenté soit par du terreau (prélevé en forêt ou dans les prairies), soit plus rarement par du crottin de cheval.

L'isolement se fait après une culture d'enrichissement en présence de phénol-lignine comme seule source de carbone. Une parcelle de terre d'environ 100 mg est ensemencée dans un tube de 18 x 240 mm contenant 5 ml de milieu liquide (milieu n° 1 Stanier). Après incubation d'un à dix jours à 25°, on examine la culture. L'isolement est obtenu par repiquage sur le même milieu solidifié par 20 p. 1 000 de gélose puis sur gélose nutritive ordinaire. La pureté des clones obtenus est vérifiée au cours de plusieurs repiquages, avec passages intermédiaires par colonies isolées.

Les résultats de l'étude de ces diverses souches ont fait l'objet d'une note préliminaire [37] et seront rapportés en détail dans les communications suivantes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. PRINGSHEIM et W. FUCHS. *Ber.*, 1923, **56**, 2095.
- [2] C. BACH. *Landw. Versuchsstation*, 1925, **103**, 223.
- [3] R. BALKS. *Landw. Versuchsstation*, 1926, **104**, 245.
- [4] R. FALCK. *Hausschwammforsch.* Heft I, Iena, 1907 ; *Cellulosechemie*, 1928, **9**, 1.
- [5] H. DEMME. Dissertation, Leipzig, 1932.
- [6] M. PHILLIPS, H. D. WEIHE et N. R. SMITH. *Soil Sci.*, 1930, **30**, 383.
- [7] G. FAHREUS. *Ann. Agr. Coll. Sweden*, 1944, **12** ; *Symbol. Botan. Upsalienses*, 1947, **9**, 2.
- [8] G. FAHREUS, R. NILSON et G. NILSON. *Sv. Bot. Tidskr.*, 1949, **43**, 343.
- [9] G. FAHREUS, R. NILSON et G. NILSON. *Roy. Agr. Coll. Sweden*, 1949, **16**, 619.
- [10] K. S. G. CARTWRIGHT et W. P. K. FINDLAY. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 1943, **18**, 145.
- [11] S. A. WAKSMAN. *Arch. Mikr.*, 1931, **21**, 136.
- [12] S. A. WAKSMAN et J. I. HUTCHINGS. *Soil. Sci.*, 1936, **42**, 119.
- [13] S. GOTTLIEB et M. J. PELCZAR. *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 55.
- [14] G. FISCHER. *Archiv. Mikr.*, 1953, **18**, 397. Dissertation. Stuttgart, 1952.
- [15] R. A. EVANS, W. H. PARR et W. C. EVANS. *Biochem. J.*, 1949, **44**, *Proceed.* VIII.

- [16] W. C. EVANS. *Biochem. J.*, 1947, **41**, 373.
- [17] B. A. KILBY. *Biochem. J.*, 1948, **43**, Proceed. V.
- [18] R. Y. STANIER. 2^e Congrès International Chim. Biol., Paris, 1953. *Symposium sur le métabolisme microbien*, 64-71.
- [19] R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1947, **54**, 339.
- [20] R. Y. STANIER et M. TSUCHIDA. *J. Bact.*, 1949, **58**, 45.
- [21] B. P. SLEEPER et R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1950, **59**, 117.
- [22] B. P. SLEEPER, M. TSUCHIDA et R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1950, **59**, 129.
- [23] R. Y. STANIER, B. P. SLEEPER, M. TSUCHIDA et D. L. MACDONALD. *J. Bact.*, 1950, **59**, 137.
- [24] R. Y. STANIER, O. HAYAISHI et M. TSUCHIDA. *J. Bact.*, 1951, **62**, 355.
- [25] O. HAYAISHI et R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1951, **62**, 691.
- [26] O. HAYAISHI et R. Y. STANIER. *J. biol. Chem.*, 1952, **195**, 735.
- [27] R. Y. STANIER et O. HAYAISHI. *Science*, 1951, **114**, 326.
- [28] R. Y. STANIER et O. HAYAISHI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 367.
- [28 a] R. Y. STANIER et J. L. INGRAHAM. *J. Bact.*, 1954, **210**, 799.
- [28 b] D. L. MAC DONALD, R. Y. STANIER et J. L. INGRAHAM. *J. Bact.*, 1954, **210**, 809.
- [28 c] W. R. SISTROM et R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1954, **210**, 821.
- [28 bis] I. C. GUNSALUS, C. F. GUNSALUS et R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1953, **66**, 538.
- [28 ter] R. Y. STANIER, I. C. GUNSALUS et C. F. GUNSALUS. *J. Bact.*, 1953, **66**, 542.
- [28 quater] C. F. GUNSALUS, R. Y. STANIER et I. C. GUNSALUS. *J. Bact.*, 1953, **66**, 548.
- [29] GRAY et THORNTON. *Zbl. Bakt.*, II, 1928, **73**, 74.
- [30] G. R. GALE. *J. Bact.*, 1952, **63**, 273.
- [31] L. KALE, V. SCHÖELLER et L. MASTAGLIO. *Cellulosechemie*, 1923, **4**, 38.
- [32] E. BECKMAN, O. LIESCHE et F. LEHMANN. *Ztschr. angew. Chem.*, 1921, **34**, 285.
- [33] E. HAGGLUND et H. URBAN. *Cellulosechemie*, 1927, **8**, 69.
- [34] F. E. BRAUNS. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 2120. *The Chemistry of Lignin*, 1952, N. Y. Ac. Press.
- [35] AULIN-ERDTMANN. *Tappi*, 1949, **32**, 160.
- [36] R. Y. STANIER. *J. Bact.*, 1947, **54**, 339.
- [37] A.-R. PRÉVOT, G. FISCHER, B. BIZZINI et M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 743.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ *IN VITRO* DU BACILLE DE WHITMORE A LA FRAMYCÉTINE

par L. CHAMBON (*).

(Institut Pasteur de Saigon.)

On sait que le chloramphénicol est l'antibiotique le plus actif *in vitro* et *in vivo* sur la majorité des souches de *Malleomyces pseudomallei*.

Cependant divers auteurs et nous-même [1] avons constaté que certaines souches présentent d'emblée une résistance variable à l'action bactéricide de cet antibiotique et que d'autres deviennent totalement résistantes au cours du traitement de malades atteints de mélioiïdose.

C'est pourquoi, reprenant les souches qui ont fait l'objet d'une étude antérieure sur ce sujet [L. Chambon et coll. (*loc. cit.*)], nous avons déterminé leur sensibilité *in vitro* à la framycétine (1) et à ses associations à d'autres antibiotiques.

I. — TECHNIQUES.

Nous avons utilisé la technique des dilutions sériées en tubes recommandée par Chas. Pfizer et C^o : une solution de framycétine à 200 µg/ml est diluée en bouillon nutritif en progression géométrique de raison 2 ; on introduit dans 0,5 ml de chacune des dilutions 0,5 ml d'une dilution à 10⁻⁴ d'une culture en bouillon nutritif de vingt-quatre heures, de façon à obtenir des concentrations finales en framycétine allant de 100 µg à 0,39 µg par millilitre.

Le point limite choisi correspond à l'inhibition totale de la croissance après vingt-quatre heures d'étuve à 37° ; nous avons de plus recherché le pouvoir bactéricide total apprécié, après quarante-huit heures d'étuve à 37°, par la stérilité des tubes de bouillon nutritif ensemencés à partir des tubes tests.

La technique de Chabbert [2] de détermination du pourcentage des survivants a été utilisée pour évaluer l'activité bactéricide de

(*) Manuscrit reçu le 23 novembre 1954.

(1) Soframycine Rpussel.

la framycétine associée à d'autres antibiotiques. Les concentrations employées correspondent aux concentrations sanguines utiles, c'est-à-dire :

Pénicilline	10 U.O./ml
Streptomycine	10 µg/ml
Chloramphénicol	15 µg/ml
Auréo-terramycine	5 µg/ml
Framycétine	2 µg/ml

II. — RÉSULTATS.

1° POUVOIR INHIBITEUR ET BACTÉRICIDE TOTAL DE LA FRAMYCÉTINE SUR LE BACILLE DE WHITMORE.

La technique des dilutions sériées appliquée à 32 souches de *Malleomyces pseudomallei* nous a donné les résultats portés sur le tableau I.

TABLEAU I. — Pouvoir inhibiteur et bactéricide total de la framycétine sur le bacille de Whitmore.

Souches N°	Total	Concentrations Minima (µg/ml)	
		Inhibitrices	Bactéricides
C.139 - 53.502 - 53.522 D A H	4	12,5	25
51.286 - 51.352 - 53.60 - 53.137 - 53.412	5	25	25
C.133 - C.144 - 51.254 - 51.271 - 51.272 - 51.274 - 51.481 - 51.492 - 51.531 - 52.92 - 53.328 - 53.430 - 53.484 - 53.489 .	14	25	50
C.141 - 51.423 - 51.433 - 52.92 - 53.490 - 53.498 53.500 - 53.526 .	8	50	50
53.491	1	50	100

La framycétine présente une action bactériostatique à la concentration moyenne de 25 µg/ml (valeurs extrêmes, 12,5 et 50 µg) et une action bactéricide totale à la concentration moyenne de 50 µg/ml (valeurs extrêmes, 25 et 100 µg).

Les trois souches 53.502, 53.522 et D. A. H., résistantes au chloramphénicol, se classent parmi les plus sensibles. Ces chiffres sont de dix et vingt fois supérieurs à la concentration

sanguine que l'on peut atteindre avec la framycétine chez les êtres humains.

2° POUVOIR BACTÉRICIDE DE LA FRAMYCÉTINE ET DE SES ASSOCIATIONS A D'AUTRES ANTIBIOTIQUES.

Nous avons précédemment montré (L. Chambon et coll., *loc. cit.*) en employant la pénicilline, la streptomycine, la terramycine, l'auréomycine et le chloramphénicol à des concentrations correspondant aux concentrations sanguines usuelles, que le chloramphénicol possède un pouvoir bactéricide élevé sur la plupart des souches de *Malleomyces pseudomallei* et que la synergie des couples chloramphénicol-auréomycine et chloramphénicol-terramycine est d'autant plus grande que le pourcentage des survivants au chloramphénicol est plus élevé ; mais cette synergie ne s'exerce pas sur les souches ayant acquis leur résistance *in vivo* au cours du traitement.

Appliquant la même technique aux mêmes souches, nous avons associé la framycétine aux antibiotiques ci-dessus indiqués.

Toutes ces associations se sont révélées indifférentes, à l'exception de l'association framycétine + pénicilline qui, aux concentrations de 2 μ g et 10 U. O./ml, s'est montrée faiblement synergique pour les trois souches de bacille de Whitmore résistantes au chloramphénicol (53.502-53.522-D. A. H.).

Afin de déterminer les concentrations minima de framycétine et de pénicilline nécessaires pour obtenir une synergie importante, nous avons réalisé toutes les combinaisons associant les concentrations de ces deux antibiotiques, allant de 2 à 10 μ g/ml pour la framycétine, et de 2 à 20 U. O./ml pour la pénicilline.

Les résultats sont indiqués par le tableau II et la figure 1. Ils montrent que la pénicilline ne possède aucune action bactéricide pour des concentrations allant de 2 à 20 U. O./ml (témoin P) et que la framycétine laisse 0,01 p. 100 de survivants pour des concentrations de 12, de 16 et plus de 20 μ g/ml (témoin F).

L'association de pénicilline à la concentration de 12-16 U. O./ml permet d'abaisser la concentration de framycétine à 6-8 μ g/ml pour obtenir un pourcentage de survivants égal à 0,01 p. 100.

Cette association est donc nettement synergique.

III. — CONCLUSIONS.

L'apparition *in vivo* de souches de bacille de Whitmore résistantes au chloramphénicol laisse le clinicien sans arme pour la poursuite du traitement de malades atteints de mélioïdose.

De telles souches résistent à des concentrations de pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine et terramycine

généralement supérieures à 100 U. O. ou 100 µg/ml et aucune association n'est synergique.

La framycétine présente une action bactéricide élevée (0,01 p. 100 de survivants) à des concentrations de 12,5 à 25 µg/ml et l'asso-

TABLEAU II. — Pourcentage de survivants en fonction des diverses associations (µg/ml et U.O./ml).

F \ P	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
2	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
4	++	++	++	++	++	100	100	1	1	1
6	++	++	++	++	++	100	0,1	0,01		
8	++	++	++	+	+	100	0,01			
10	++	++	++	+	100	0,01				
										Tm P.20 : ++ Tm F.12 : 0,01

Souche 53.502

F \ P	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
4	++	++	++	++	++	+	+	+	10	0,1
6	++	++	++	++	+	1	0,01			
8	++	++	++	++		0,01				
10	++	++	++	++	+	0,01				
										Tm P.20 : ++ Tm F.16 : 0,01

Souche 53.522

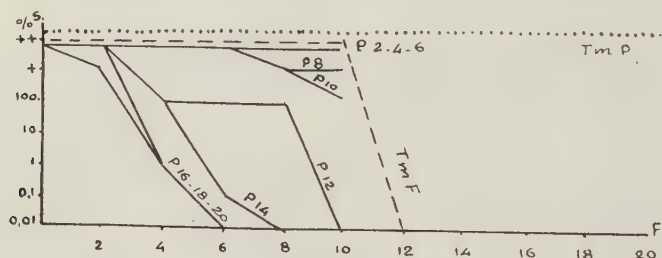
F \ P	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
4	++	++	++	++	++	+	+	+	+	100
6	++	++	++	++	++	100	100	10	10	0,1
8	++	++	++	++	++	1	1	0,01		
10	++	++	++	+	+	0,01				
										Tm P.20 : ++ Tm F.20 : 0,1

Souche D.A.H.

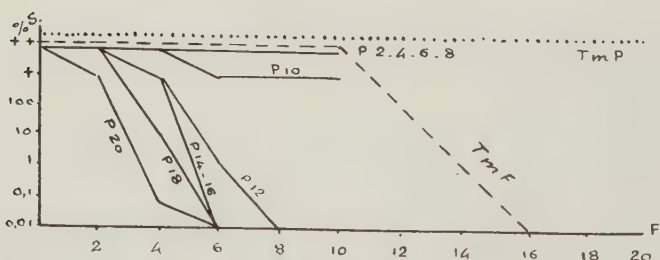
(Tm P et Tm F indiquent le pourcentage de survivants [de + à 0,01 p. 100] laissé par des concentrations de pénicilline et de framycétine, utilisées séparément, égales ou inférieures à 20 µg/ml et U.O./ml.)

ciation framycétine-pénicilline (dans une proportion de moitié à un tiers) permet d'abaisser ces concentrations à 6-8 µg/ml pour un même effet bactéricide. Ces chiffres sont supérieurs à la concentration sanguine que l'on peut obtenir avec la framycétine. Cette association paraît donc sans intérêt pour le trai-

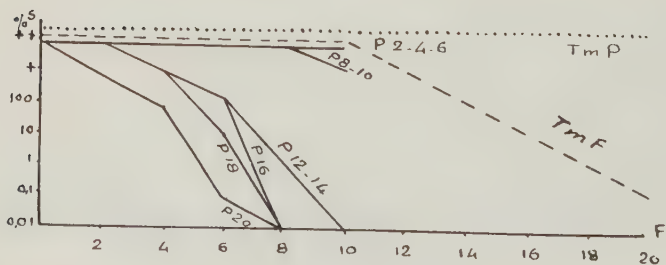
tement des septicémies à bacilles de Whitmore. Mais elle est peut-être utile, en apport *in situ*, dans les suppurations localisées, les arthrites, les méningites, les pleurésies et surtout,



S. 53.502



S. 53.522



S. D. A. H.

FIG. 1. — Synergie de l'association pénicilline (P) — framycétine (F) pour trois souches de bacille de Whitmore résistantes au chloramphénicol.

sous forme d'instillations endo-bronchiques ou d'aérosols, dans les abcès pulmonaires où le staphylocoque et le bacille pyocyanique, très sensibles à la framycétine, sont souvent associés au bacille de Whitmore.

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié l'action de la framycétine et de ses associations à d'autres antibiotiques sur *Malleomyces pseudomallei*. Cet antibiotique exerce une action inhibitrice à la concentration moyenne de 25 µg/ml, supérieure à celle qui peut être obtenue dans le sang. L'association framycétine + pénicilline, synergique dans certaines conditions pour les souches résistantes au chloramphénicol, est peut-être utile pour le traitement *in situ* des formes localisées de la mélioiidose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. CHAMBON, P. DE LAJUDIE et J. FOURNIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 139.
- [2] Y. CHABBERT. *Ces Annales*, 1953, **84**, 545.

PASSAGE DANS LE SANG DE LA TÉTRACYCLINE

par M^{me} J. COUTURE, M^{me} M.-A. MAILLARD et M. Maurice DUBOST(*).

(Laboratoire Rhône-Poulenc-Spécia.)

La Tétracycline (*Sanclomycine*, *Achromycine*) est un antibiotique obtenu par hydrogénation catalytique de la Chlortétracycline ; elle aurait été également isolée à partir d'une culture d'un *Streptomyces*.

La Tétracycline est voisine de la Chlortétracycline (*Auréomycine*) et de l'Oxytétracycline (*Terramycine*) ; elle présente un spectre d'activité très proche de ces deux antibiotiques. Elle donne naissance *in vitro* à des résistances croisées complètes [1]. Son intérêt réside surtout dans le fait que, par voie gastrique ou par voie locale, cet antibiotique est mieux toléré que les deux autres tétracyclines ; c'est pourquoi il est de plus en plus étudié et utilisé.

De nombreux auteurs ont déterminé les « tétracyclinémies » au cours de diverses modalités d'emploi de la Tétracycline, soit pour comparer ce nouvel antibiotique aux deux autres tétracyclines, soit pour comparer entre eux divers modes d'introduction ou diverses posologies de cet antibiotique. On s'accorde généralement pour considérer que les taux sanguins sont particulièrement élevés avec la Tétracycline simple (S. S. Wright [1], L. E. Putnam [2], Finland et coll. [3]).

Aubré de L. Maynard et coll. [4], Waddington et coll. [5] ont spécialement étudié la *voie veineuse*, le premier chez 6 adultes, le second chez 10 malades ; après injection intraveineuse de 500 mg, l'antibiotique diffuse rapidement dans les liquides de l'organisme, mais on en retrouve très peu dans les fèces.

La même dose, en perfusion pendant six heures, fournit des teneurs croissant lentement et arrivant à la sixième heure à un niveau plus élevé que celui que donne l'injection intraveineuse.

La figure 1 représente les chiffres trouvés.

Pour la voie orale, ces mêmes auteurs, ainsi que Putnam [2], ont administré la Tétracycline par doses de 0,250 g ou 0,500 g répétées toutes les six heures. Avec 0,250 g, ils ont obtenu des niveaux très bas (0,5 mcg/ml à 1 mcg/ml) pendant les cinq premières heures après la première administration ; par contre, après

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 décembre 1954.

la deuxième ou la troisième prise, ils arrivent à 2 mcg/ml, pour atteindre le troisième jour du traitement 2 à 3 mcg/ml, teneurs qui se maintiennent ultérieurement [5]. Avec 0,500 g, après une seule dose, les taux sont de l'ordre de 1 mcg/ml, mais après la deuxième ou la troisième administration la plupart des malades offrent des teneurs variant de 5 à 10 mcg/ml le troisième jour [5].

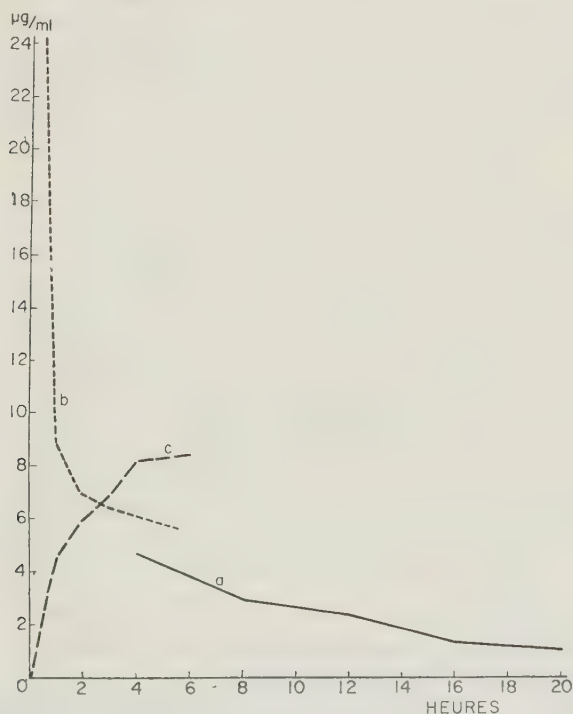


FIG. 1. — Tétracyclinémies après une injection intraveineuse de 500 mg.

- a ——— moyenne de 6 malades (Aubré de L. Maynard) [4].
- b - - - - - moyenne de 10 malades (S. Waddington) [5].
- c ——— moyenne de 10 malades (S. Waddington) après perfusion pendant 6 h.

D'autres chercheurs, ainsi que nous-mêmes, ont étudié plus particulièrement la circulation de la Tétracycline (*Sanclomycine*) après des prises uniques de 0,250 g, 1 g et 2 g. Finland [3], après la dose de 1 g administrée à 12 volontaires, fait état du résultat suivant : le clocher est atteint entre la quatrième et la sixième heure après l'administration ; il se tient entre 1 et 4 mcg/ml et reste à peu près aussi élevé pendant huit à douze heures. Purcell [7] obtient des résultats analogues. Putnam [2] a étudié

les concentrations sériques après différents dosages : la figure 2 rapporte les chiffres qu'il a obtenus.

Les divers auteurs cités ont généralement employé pour leurs dosages la méthode des dilutions successives en présence de *B. cereus mycoides* n° 5 [6]. Ce germe présente l'avantage d'être peu sensible à la teneur en sérum du milieu sur lequel on le cultive. Ceci permet d'opérer sans tenir compte de la concentration en sérum des différents tubes de dosage et par conséquent sans ajouter de sérum ni pour la gamme étalon ni pour la gamme échantillon. De plus, cette méthode est sensible jusqu'à

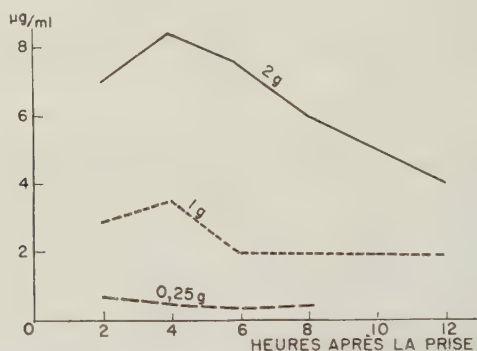


FIG. 2. — Tétracyclémies après prise unique, par voie buccale, de :

— 2 g
 - - - 1 g
 — 0,25 g

0,06 mcg/ml dans le sang. Par contre, ces résultats ne sont pas très précis, car les dilutions successives sont faites de 2 en 2.

Bien que la méthode précédente ne demande que peu de matériel et n'exige pas de sérum complément, nous lui avons préféré la méthode que nous utilisons pour les dosages de la Chlortétracycline, méthode à laquelle l'un de nous, M. Dubost, a apporté quelques améliorations.

C'est une méthode turbidimétrique basée sur l'inhibition de la croissance du staphylocoque doré. Elle nous a permis de doser avec précision 0,3 U/ml et de déceler jusqu'à 0,15 U/ml. La technique est la suivante.

1° ORGANISME D'ESSAI. — L'organisme d'essai est le staphylocoque doré 209 P. Ce germe présente une culture plus abondante en présence de sérum. Il est donc important d'amener tous les tubes de dosage à une concentration égale en sérum. Nous avons fixé ce taux à 3 p. 100, mais dans le cas de tétracyclémie

faible, il est possible de l'augmenter jusqu'à 5 p. 100, sans grand inconvénient.

2° MILIEUX DE CULTURE. — a) On conserve la souche sur le milieu suivant :

Peptone, 20 p. 1 000 ; glucose, 2 p. 1 000 ; ClNa, 5 p. 1 000 ; gélose, 20 p. 1 000 ; pH = 7,4.

b) Pour la préparation de la semence et pour le dosage proprement dit, on emploie le milieu suivant :

Extrait de viande, 1,5 p. 1 000 ; extrait de levure, 3 p. 1 000 ; peptone, 6 p. 1 000 ; glucose, 1 p. 1 000 ; PO_4HNa_2 12 OH₂, 10 p. 1 000 ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,8 p. 1 000 ; pH = 7,4.

3° ENSEMENCEMENT. — Une culture de staphylocoque doré obtenue après une incubation de vingt-quatre heures à 37° sur gélose inclinée de formule 2° a), est récoltée en totalité par lavage de la surface de la gélose avec 10 ml d'eau distillée stérile.

La suspension obtenue est transférée dans une fiole d'Erlenmeyer de 300 ml renfermant 150 ml de milieu 2° b). On laisse incuber pendant une heure trente au bain-marie à 37°. La culture qui en résulte constitue la semence. On ensemence le milieu de dosage avec 35 p. 1 000 de cette culture.

4° PRÉPARATION DES TUBES DE CULTURE. — a) *Gamme étalon.* — On utilise, comme étalon, du chlorhydrate de Tétracycline pure. On en prépare deux solutions à 2 U/ml et à 0,2 U/ml en bouillon, qui permettent de composer les gammes suivantes :

	SOL. A 2 U/ML	SOL. A 0,2 U/ML	T
Sol. de Tétracycline.	0,15 0,10 0,075 0,05	0,25 0,15 0,10	0
Sérum de complément	0,15 0,15 0,15 0,15	0,15 0,15 0,15	0,15
Bouillon 2) b).	0,20 0,25 0,275 0,30	0,10 0,20 0,25	0,35
Bouillon ensemencé 3)	4,5 4,5 4,5 4,5	4,5 4,5 4,5	4,5
Concentrations en U/ml	0,06 0,04 0,03 0,02	0,01 0,006 0,004	0

Cette gamme est préparée en double exemplaire.

b) *Gamme échantillon à doser.* — Pour le sérum de titre inconnu on prépare la gamme suivante avec le sérum pur et une dilution au 1/10 en bouillon de ce sérum.

Comme on le constate, les deux premiers tubes de cette gamme renferment respectivement 5 et 4 p. 100 de sérum au lieu de

	SÉRUM PUR						SÉRUM DILUÉ AU 1/10			T
Sérum à doser.	0,25	0,20	0,15	0,10	0,075	0,05	0,25	0,15	0,05	0
Sérum de complément . .	0	0	0	0,05	0,075	0,10	0,125	0,13	0,145	0,15
Bouillon 2) b)	0,25	0,30	0,35	0,35	0,35	0,35	0,125	0,215	0,315	0,35
Bouillon ensemencé 3).	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

3 p. 100 dans tous les autres tubes. Cela est nécessaire pour les sérums de faible concentration en Tétracycline, mais n'affecte pas beaucoup la précision du dosage. Par contre, pour les tétracyclinémies élevées, ces deux tubes sont supprimés. Si le titre du sérum était estimé à plus de 2 U/ml, il conviendrait de le diluer pour l'amener à un titre voisin de 2 U/ml.

On prépare la gamme ci-dessus en double exemplaire.

5° CULTURE. — Les tubes de culture ainsi préparés sont plongés simultanément dans un bain-marie à 37° où ils sont maintenus trois heures trente à quatre heures. Après ce temps, ils sont retirés du bain-marie et, immédiatement, 1 goutte de formol au tiers est ajoutée à chaque tube.

6° LECTURE. — Une petite quantité de milieu de culture ensemencé et formolé, conservé en glacière, est utilisée pour régler le zéro de l'électrophotomètre au cours de la mesure des opacités des tubes de culture. Les mesures sont faites sous une épaisseur de 10 mm, dans une lumière de longueur d'onde 650 mμ.

Généralement, on obtient des opacités de densités optiques allant de 0,1 à 0,8.

7° CALCUL DU TITRE. — Les opacités de tous les tubes ayant été mesurées, on fait la moyenne des lectures des deux tubes identiques préparés pour chaque concentration.

Sur un papier semi-logarithmique, on porte en abscisses (échelle logarithmique) les concentrations de la gamme étalon, en ordonnées les opacités mesurées (échelle arithmétique). Les moyennes des lectures étalon ayant été portées sur le graphique en face des concentrations correspondantes, on trace la courbe.

On porte ensuite sur la courbe étalon les différentes moyennes de lectures de la gamme échantillon et on lit sur l'échelle des abscisses la concentration en Tétracycline correspondante à chacune de ces moyennes. On ne prend en considération que les valeurs situées sur la partie droite de la courbe.

Le titre cherché est obtenu en faisant la moyenne de ces valeurs et en multipliant le chiffre trouvé par la dilution initiale du sérum échantillon considéré.

REMARQUES. — Il est nécessaire, pour chaque détermination, d'avoir à sa disposition 2 ml de sérum échantillon et 1,5 ml de sérum complémentaire, auquel il convient d'ajouter 3 ml de sérum de complément pour la préparation des gammes étalon.

Cette méthode présente l'avantage de fournir des titres assez précis et d'être sensible à des doses assez faibles de Tétracycline. Nous avons vérifié le fait sur des préparations de sérum tétracycliné faites au laboratoire ; le titre trouvé ne s'écartait jamais de plus de 5 p. 100 du titre préparé.

Voici le résultat de nos travaux personnels : après une prise buccale unique de 1 g de Tétracycline (*Sanclomycine*), les teneurs

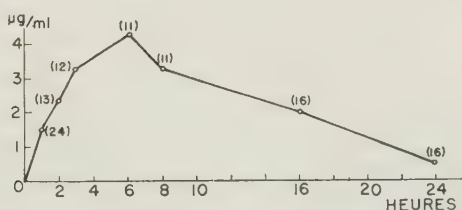


FIG. 3. — Tétracyclinémies après prise unique, par voie buccale, de 1 g, d'après notre expérience (Entre parenthèses : nombre de malades ayant servi au calcul des moyennes).

sanguines en antibiotique ont été les suivantes et ont permis la construction de la courbe 3.

Heures	1	2	3	6	8	16	24
Nombre de malades .	24	13	22	11	11	16	16
Taux sanguin moyen en mcg/ml	1,45	2,36	3,30	4,26	3,33	1,98	0,48

EN RÉSUMÉ. — On peut déduire de ces chiffres que la concentration sanguine en antibiotique monte jusqu'à la sixième heure où elle atteint 4 mcg/ml, pour descendre ensuite, lentement, puisque l'antibiotique est encore dosable à la vingt-quatrième heure.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. S. WRIGHT et M. FINLAND. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 1, 40.
- [2] L. E. PUTNAM, D. HENDRICKS et H. WELCH. *Antibiot. Chemoth.*, 1953, **3**, 12, 1183.

- [3] M. FINLAND, E. M. PURCELL, S. S. WRIGHT, B. D. LOVE, T. W. MOU et E. F. KASS. *J. Amer. Med. Ass.*, 1954, **154**, 561.
- [4] AUBRE DE L. MAYNARD, J. C. ANDRIOLA et AARON PRIGOT. *Antibiotics Annual*, 1953-1954, p. 102.
- [5] W. S. WADDINGTON, GORDON G. BERGEY et ROBERT L. NIELSEN. *Amer. J. med. Sci.*, 1954, **228**, 164.
- [6] A. C. DORNBUSH et E. J. PELCÁK. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1948, **51**, 118.
- [7] E. PURCELL, S. WRIGHT, T. W. MOU et M. FINLAND. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 61.

STUDIES ON THE LIFE CYCLE OF THE TUBERCLE BACILLUS (BCG)

By Sol Roy ROSENTHAL and Beatrice HEAGAN (*).

[*University of Illinois, Institution for Tuberculosis Research ;
Research Foundation ;
Chicago Municipal Tuberculosis Sanitarium ;
Chicago, Illinois*] (**).

The method of reproduction of the *Mycobacterium tuberculosis* is not definitely settled. Much work on this subject has been reported since Robert Koch [1] first described the tubercle bacillus (1882) and believed that the non-stainable dark granules seen in the organisms were spores. Malassez and Vignal [2] as early as 1883 believed that the granules seen in the body of the organism were important factors in the multiplication of the organisms, whereas Much [3] (1907) believed that the non acid-fast gram positive granules found in tuberculous sputa were degenerative forms of the bacillus. In 1910, Fontes [4] described a non visible filterable form. He made suspensions of caseous tuberculous material obtained from guinea pigs which had been infected with human tubercle bacilli and filtered through a Berkefeld filter. These filtrates inoculated into guinea pigs in series produced tubercles only after the second transfer; the first passage produced only a swelling of the lymph nodes. Similar results were obtained by Hauduroy and Vaudremer [5] followed by Calmette and his school [6]. The validity of these studies was questioned by Plotz [7] and Walker and Sweeney [8]. They filtered suspensions of tubercle bacilli through Seitz, Berkefeld (W or U and N), Chamberlain (L2 and L3) and were able to recover tubercle bacilli in over 50 % of the filtrates, either by electrolysis or centrifugation. Schmidt [9] reported that the conditions produced by injecting filtrates in guinea pigs could be reproduced when suspensions with few bacilli were inoculated into guinea pigs.

Kahn [10] described a life cycle of a single tubercle bacillus observed in a fine pipette containing Long's synthetic media

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} octobre 1954.

(**) Aided partly by USPHS grant # G788.

(Chambers micromanipulation technique). He recorded over a period of 8 to 12 days the transformation of the bacillus into first granular, then coccoid forms which continued to subdivide until they became too small to measure. Small groups of dust-like accumulation formed from which filamentous forms developed. These continued to enlarge into rods of mature bacilli. In the process, the acid-fast character was lost in the granular phases and was recovered in the rod and bacillary stages. Kahn did not find that the granular form passed Berkefeld filters (N, D, or W) as determined by culture or guinea pig inoculation (one passage only). He claimed that serial inoculations may be complicated by contamination. Kahn found this cyclic pattern in the human and bovine varieties but not the *smegmatis*, rat leprosy or in the avian strains of the *Mycobacterium*. He used in addition to the above, the method of fixing cultures, imbedding in paraffin, cutting and staining in varying stages of development. Wyckoff and Smithburn [41] viewing the growth of *M. phlei* by motion picture, noted no true cycle, but on aging of the culture, coccoidal bodies appeared. These elongated and grew out when placed in fresh medium. Some authors have described a sexual as well as an asexual life cycle of the tubercle bacillus (Lindegren and Mellon [42]). The majority of workers believe that division of the tubercle bacillus is by simple fission and that the granules represent a resting or degenerative phase [43, 44]. More recently, Mudd and associates [44] have described nuclei and mitochondria in the tubercle bacillus by using differential stains and consider them to be the normal cytology of the cell. Multiplication by direct fission and through a granular phase was noted by Bretey and Imelik for avian tubercle bacilli [45, 46]. Three possibilities in reproduction of tubercle bacillus have been described :

1° Simple fission, where granules or coccoid forms are considered as resting or degenerative,

2° Reproduction cycle where granules are considered as a phase of the life cycle, and

3° Combination of 1 and 2 ; that is, under ideal conditions division is by direct fission and that under adverse conditions, granules appear which form the nucleus of a new cell.

Studies on the method of reproduction of BCG are few. The authors approached the problem by the following methods :

1° Light microscope : Viewing smears of cultures at varying stages and stained by Ziehl-Neelsen (Rosenthal [47 a]).

2° Phase microscope : Viewing unstained specimens of cultures at varying intervals or continuous observation of slide cultures.

3° Electron microscope : Viewing shadow casted (chromium) specimens of cultures at varying intervals.

The source of the culture was the surface growth from bile

potato, since on this medium the cells were more uniform in size and shape and were more discrete.

LIGHT MICROSCOPE.

Smears were made directly from bile potato cultures at hourly and daily intervals over a period of 14 days. The smears were fixed with methyl alcohol and stained with carbolfuchsin in the cold. The counterstain was methylene blue. By this method the development of bacilli was reconstructed as follows. The adult bacillus is a curved rod with concentration of the bacillary cytoplasm at various points in the bacillus to form granules or segments. The bacillus first becomes elongated, and in doing so, there is an accentuation of the granules or the concentrations of the bacillary substance. The acid-fast character of the organisms is then lost and non acid-fast granular forms contained in a pale blue staining matrix is noted. The granules remain arranged in linear fashion corresponding to the shape of the bacillus. These granules or segments elongated into delicate non acid-fast or lightly acid-fast rods which contained a single granule or double polar granules. The bacilli mature at the expense of the polar granules which diminish in size as the acid-fast character of the organisms becomes more evident. In this stage, there is no concentration of bacillary material to form segments or granules (See fig. 1). They develop granules with maturity. Under the conditions of this experiment, about 7 days were required for a complete cycle, that is, from adult cell to adult cell (Rosenthal [47 a]).

PHASE MICROSCOPE.

Suspensions of bile potato cultures were made in water or Youmans to which albumin and 2 % agar was added in order to reduce the mobility of the organisms. The suspensions were placed on sterile glass slides and covered with sterile coverslips. The edges were sealed with paraffin or wax, and in the case of the incubated slides, holes were made with thin needles on either side of the slides through the paraffin or wax. Incubation was carried out either in a microscope stage incubator or in a regular incubator. Viewing was done during the day only, but growth was continued for periods as long as 9 days. At regular intervals, the slides were placed in the icebox or deep freeze. Each series was fixed with methyl alcohol and stained with Ziehl-Neelsen at the same time. The growing conditions of the organisms were not ideal, but growth did occur as was readily noted by viewing slides under a hand lens. After certain periods of time, the island became enlarged and appeared much like tissue cultures. It was

difficult to watch single bacilli, since they moved despite the fact that 2 % agar was used. When colonies were viewed, the central portion was usually composed of meshes of bacilli which were den-

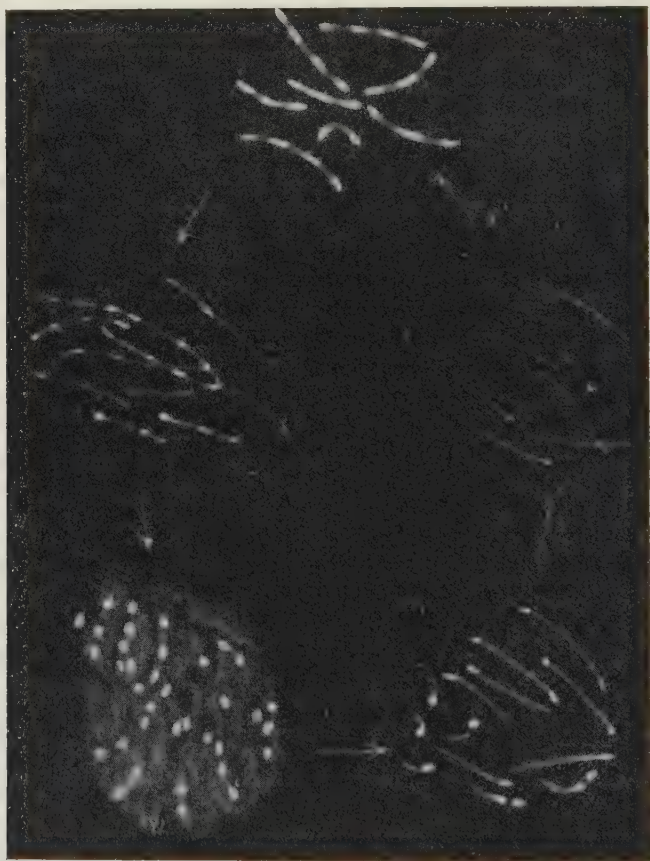


FIG. 1. — The life cycle of the tubercle bacillus (BCG). The mature bacilli are at the top of the figure. As indicated by the arrows, the bacilli first become elongated, then non acid-fast granules are seen in a blue staining matrix (Ziehl-Neelsen stain). This is followed by elongation of the segments or granules into delicate bacilli which at first are not granular, and finally the mature bacilli with granules develop (see text).

sely granular. From the edges of the colonies delicate non granular bacilli extended. Frequently, fine delicate individual bacilli, a fraction of the size of the mature organisms were noted free near the clumps. They were usually actively motile. When single bacilli

could be observed, it was noted that they appeared in varying lengths suggesting the division of a mature bacillus into two to four segments. Not infrequently two segments would be adherent end to end each moving actively. No definite fission was seen, but in some instances it was strongly suggested. From these preparations, it would appear that both the granular method and the fission method of reproduction took place. The former was more common in the slide culture studies where the growing conditions were probably not ideal, whereas the latter was more common in the direct observation from growing cultures on bile potato, where the growing conditions were more favorable. In some specimens, all the stages described in the granular method of reproduction were observed, whereas actual fission was not seen.

ELECTRON MICROSCOPE.

Bile potato cultures were sampled hourly and daily for a period up to 7 days. Suspensions were made by gently shaking the culture in water and these suspensions were placed on celloidin covered steel grid type screens and allowed to dry. The screens were then shadow casted with chromium in vacuo (for method, see Reed, Rosenthal and Reed [48]). They were viewed under the electron microscope. In several hundred observations in 30 or more cycle studies, it was noted that of the two strains followed, one had a granular stage at 29 hours and the other at 40 to 44 hours. As seen in the figures, the following stages were observed :

The bacilli became elongated and the concentrations of the cytoplasm became prominent in the form of granules of varying size (pl. I, fig. 1). The granules became more prominent and defined while the cell outlines less so (pl. I, fig. 2). The granules were then noted to leave the cells (pl. I, fig. 3). The free granules were spherical in shape and regular as noted by the shadows they cast (pl. I, fig. 4). When granules appeared, they predominated all other forms on a given screen. Ghosts of cells appeared frequently (pl. I, fig. 3). Following the granular stage, elongated dumbbell shapes were seen suggesting that the granule had elongated (pl. I, fig. 5). Small bacilli were then noted and finally the mature slightly curved granular forms.

From the work of Rosenthal et al. with light [47 a], phase and electron microscope, it seems that a granular or spherical or rod-shaped stage is definitely a part of the reproduction cycle of BCG on artificial culture media under certain conditions. This stage occurred early in the cycle of the organisms and depended upon the strain used (29 to 44 hours). These granules or rods leave the mother cell and develop outside of it, leaving an empty shell

behind. About 7 days elapse for the entire cycle to be completed; that is, from adult cell to adult cell. Whether this is the usual method of reproduction was not definitely established. By phase microscopy, it was noted that free granules were rare unless a certain amount of drying occurred, or as in the slide cultures where the possibility of low oxygen tension may have taken place. These are the conditions which probably existed in the studies of Kahn (capillary pipette technique [10]).

No definite fission was observed in any of the methods described (also Werner [19]), but it was strongly suggested. It seems possible that both methods of reproduction occurred.

The duration of the cycle was approximately 7 days under the conditions of this experiment. The generation time during the exponential growth phase reported for human virulent tubercle bacilli [20] or BCG [21] when grown in fluid media is short. Nitrogen determination or photometry was mainly used as the index of growth. These young bacilli are only a fraction of the size of the adult organism [16]. Actual counts and viability studies were made by Fenner and Leach [21] for BCG grown in fluid media, who report a 15 to 32 hour generation time.

Granules within the tubercle bacillus have been frequently described in studies with the electron microscope. These varied in size from 20 μ to 830 μ (Ruska et al. [22], Lembke [23], Werner [19], Knaysi et al. [24]). Whether these granules are nuclei (Mudd et al. [14], Knaysi et al. [24]) or simply meta-chromatic granules (Werner [19]) has not been decided. There is not agreement as to whether these granules are part of a cycle of growth of the tubercle bacillus. Knaysi et al. [24] have described division of these bodies.

The significance of the existence of a life or growth cycle is that the varying phases may influence the tissue response or dissemination in the host. Rosenthal has shown that following the intradermal injection of BCG, for example, the granular non acid-fast form is readily seen free in tissue sections [25]. By injecting emulsions of the internal organs of guinea pigs that had been inoculated with BCG either intracardially or intradermally in series he obtained positive post-mortem cultures from the organs of such animals, although the cultures of original inoculum were negative [17]. This may have been the result of a few organisms present, but may also have been the result of maturation of granules. The latter hypothesis is suggested since a generalized response of the reticulo-endothelial system of the internal organs followed intradermal inoculation of BCG. Its generalization cannot be accounted for by the number of bacilli found in these organs. Although a nervous mechanism may be involved, there is no way at hand to prove this hypothesis. To

further stress the possible diffusion of granules, the following experiment is cited (Rosenthal [47 a]). Guinea pigs were inoculated with BCG by the multiple puncture method and the site of inoculation was removed plus a zone 1 to 2 cm around it (including subcutaneous tissues) at intervals of 5 minutes to 10 days after inoculation. All of the animals finally reacted to 0,2 ml of 1 : 10 dilution of O. T., albeit that in the group where the skin was removed up to 2 hours or less after inoculation, it took 3 months to develop, whereas in those animals where the skin was removed three hours and later it was already noted after one week (See also Boquet [26]).

Filtration of young cultures (20 to 72 hours) through a Seitz or Berkefeld filter (W) and viewed under the electron microscope after centrifugation or not did not reveal granules of the size seen in the reproduction cycle. Cultures of such filtrate on egg media were always sterile [27]. On rare occasions (6 out of 111 experiments) smaller spherical bodies were noted, which were within the range of the size of virus or bacteriophage (50 to 110 m μ). Filtrates of young cultures uniformly inhibited the growth of BCG in fluid media. This phenomenon occurred irrespective of the presence of the small forms or not. The inhibitory phenomenon was maintained when the filtrates were transferred in series. As many as 5 generations retained this property, but it was not augmented. The inhibitory property could be slightly concentrated by freeze drying but not by alcohol precipitation (15 to 25 % methyl alcohol). No anti-inhibitory antibodies could be formed by inoculating the filtrate into rabbits. Such filtrates would not inhibit or lyse young actively growing cultures in fluid media or produce plaques on solid media (Rosenthal and Heagan [27]). The exact nature of this phenomenon is not entirely understood. It may be an inhibitory phase in the growth cycle of BCG.

SUMMARY.

BCG, under certain conditions, has a definite reproduction cycle. The cycle consisted of an elongation of the organism, a concentration of the cytoplasm to form granules or small rods, an emptying of the cell of these bodies and finally the development of these granules into mature bacilli. Although no direct fission was noted, either by staining and viewing by the light microscope or by direct observation in the phase microscope or by the electron microscope, it was suggested, especially under ideal growth conditions. Most probably, both methods of reproduction normally occur for BCG. An interesting phenomenon whereby filtrates of young cultures caused inhibition of the growth of BCG was observed.

We wish to thank Bessie Reed and Dr Carlos I. Reed for their operation and advice in regard to the electron microscope.

BIBLIOGRAPHY

- [1] R. KOCH. *Berl. klin. Wschr.*, 1882, **19**, 221.
- [2] L. MALASSEZ and W. VIGNAL. *Arch. physiol. norm. path.*, 1883, **2**, 369. *C. R. Soc. Biol.*, 1883, **4**, 650.
- [3] H. MUCH. *Beitr. Z. klin. Tuberk.*, 1907, **8**, 85.
- [4] A. FONTES. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1910, **2**, 141.
- [5] P. HAUDUROY and A. VAUDREMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 1276.
- [6] A. CALMETTE and J. VALTIS. *Ces Annales*, 1930, **44**, 629. — A. CALMETTE, J. VALTIS and M. LACOMME. *La Presse Méd.*, 1926, **34**, 1409.
- [7] H. PLOTZ. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **199**, 387.
- [8] E. L. WALKER and M. A. SWEENEY. *J. infect. Dis.*, 1934, **54**, 182.
- [9] G. W. SCHMIDT. *Ztschr. Hyg.*, 1931-1932, **413**, 90.
- [10] M. C. KAHN and J. C. TOREY. *Am. Rev. Tuberc.*, 1928, **18**, 850. — M. C. KAHN. *Am. Rev. Tuberc.*, 1929, **20**, 150. — M. C. KAHN and F. J. NONIDEX. *Am. Rev. Tuberc.*, 1936, **34**, 361.
- [11] R. W. WYCKOFF and K. C. SMITHBURN. *J. infect. Dis.*, 1933, **53**, 201.
- [12] C. C. LINDEGREN and R. R. MELLON. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1932, **30**, 110.
- [13] J. NEDELKOVITCH. *Ces Annales*, 1936, **57**, 171. — H. C. SWEENEY. *J. Am. med. Assoc.*, 1926, **87**, 1206. — E. ESPERSEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1949, **26**, 178.
- [14] S. MUDD, L. C. WINTERSCHIED, E. D. DELAMATER and H. S. HENDERSON. *J. Bact.*, 1951, **62**, 459. — L. C. WINTERSCHIED and S. MUDD. *Am. Rev. Tuberc.*, 1953, **67**, 59.
- [15] J. BRETEY and S. IMELIK. *Ces Annales*, 1949, **77**, 228.
- [16] S. IMELIK and J. BRETEY. *Ces Annales*, 1949, **77**, 597.
- [17 a] S. R. ROSENTHAL. *The general tissue and humoral response to an avirulent tubercle bacillus*, Univ. of Ill. Press edit., Urbana, 1938.
- [17 b] S. R. ROSENTHAL. *Arch. Path.*, 1936, **22**, 348.
- [18] C. I. REED, S. R. ROSENTHAL and B. P. REED. *Ces Annales*, 1948, **75**, 504.
- [19] G. H. WERNER. *Electron Microscopic Studies of the Cellular Morphology of the Tubercle Bacillus in Tuberculosis Research. IV*: S. Karger, éd., Bâle, 1951.
- [20] G. P. YOUMANS. *J. Bact.*, 1946, **51**, 703. — W. F. KIRSCHHEIMER and G. P. YOUMANS. *Am. Rev. Tuberc.*, 1952, **66**, 486. — F. FENNER and R. H. LEACH. *Am. Rev. Tuberc.*, 1953, **68**, 321.
- [21] F. FENNER and R. H. LEACH. *Am. Rev. Tuberc.*, 1953, **68**, 342.
- [22] H. RUSKA, A. LEMBKE and J. CHRISTOPHERSEN. *Klin. Wschr.*, 1940, **49**, 217.
- [23] A. LEMBKE. *Zbl. Bakt.*, I, Orig., 1947, **152**, 239.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ HÉRÉDITAIRE AU GAZ CARBONIQUE CHEZ LA DROSOPHILE

II. INSTALLATION DU VIRUS σ DANS LA LIGNÉE GERMINALE A LA SUITE D'UNE INOCULATION

par G. BRUN et A. SIGOT (*).

(Laboratoire de Génétique Formelle du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette
[professeur L'HÉRITIER]
et Laboratoire de Biologie générale de la Faculté des Sciences
de Strasbourg.)

INTRODUCTION.

Les expériences de N. Plus ont montré qu'il existe des différences entre les drosophiles sensibles suivant qu'elles appartiennent à une « souche pure sensible » ou qu'elles ont acquis la sensibilité à la suite d'une injection. La mise en évidence de ces différences a fait l'objet de la précédente publication de cette série (N. Plus, 1955).

Rappelons ces différences ; elles résident :

1° Dans le rythme de la multiplication du virus et le rendement final ;

2° Dans les modalités de la transmission de la sensibilité.

Les courbes de multiplication du virus dans les mouches injectées sont analogues, quels que soient le stade biologique de l'hôte inoculé et le titre de l'inoculum initial ; elles sont par contre assez nettement distinctes de celle qui correspond aux mouches de souche pure sensible. De plus, chez ces dernières, le palier final s'établit à un niveau inférieur aux niveaux obtenus avec les mouches inoculées.

Les différences dans les modalités de la transmission de la sensibilité sont encore plus nettes. A quelques exceptions près, les femelles de souche pure ne donnent naissance qu'à des mouches sensibles qui ont aussi les caractères typiques de l'état « héréditaire sensible ». Cet état est donc stable en ligne maternelle. Au contraire, les femelles inoculées ne transmettent la sensibilité qu'à une partie de leur descendance ; la fréquence des

(*) Manuscrit reçu le 24 novembre 1954.

sensibles, que nous appelons valence (1), évolue au cours du temps : elle passe par un maximum, puis décroît.

Quant aux mâles inoculés, ils ne transmettent jamais la sensibilité à leurs descendants (L'Héritier et Hugon de Scoeux, 1947), alors que les mâles d'une souche pure sensible la transmettent partiellement. La fréquence de la transmission de la sensibilité, ou valence de ces mâles, est une caractéristique de chaque souche sensible ; elle a été l'objet de plusieurs travaux (Goldstein, 1949, 1951 ; Sigot, 1953).

L'Héritier et Teissier (1945) avaient déjà montré que les fils sensibles de ces mâles transmetteurs ne transmettent jamais la sensibilité. N. Plus a montré récemment (1954, 1955) que, par toutes leurs caractéristiques, les mouches tenant la sensibilité de leur père sont analogues aux injectées. Nous avons donc été conduits à penser que toutes les drosophiles sensibles se rattachent à l'un ou l'autre des deux types étudiés par N. Plus, que nous appellerons désormais, d'une façon plus générale, le *type stabilisé* correspondant aux mouches de souche pure sensible, et le *type non stabilisé* correspondant aux mouches inoculées ou tenant la sensibilité de leur père. Les trois points qui permettent de caractériser ces deux types de mouches sont résumés dans le tableau ci-contre :

	NON STABILISÉES	STABILISÉES
1° Rendement en virus infectieux.	Élevé.	Moins élevé.
2° Valence des femelles	< 100 p. 100, subissant une évolution caractéristique.	Constante = 100 p. 100.
3° Valence des mâles	Nullé.	Non nulle.

Remarquons tout de suite l'opposition entre le rendement faible en virus infectieux et la meilleure transmission de la sensibilité chez les mouches stabilisées ; la transmission est même parfaite chez les femelles de cette catégorie. Nous avons pu nous convaincre en effet, en recueillant individuellement la descendance de nombreuses femelles de souche pure sensible, que la valence de ces femelles est effectivement 100 p. 100, à de rares exceptions

(1) Terme défini par Goldstein (1949) comme « le pourcentage de sensibles engendrés par des individus sensibles, tant mâles que femelles, après croisement à des conjoints résistants ».

près qu'il est permis de comparer à des mutations bien qu'elles soient notablement plus fréquentes. Cette stabilité des souches pures sensibles en est le caractère le plus frappant.

Nous savons, d'autre part, qu'on finit généralement par obtenir des lignées pures sensibles en sélectionnant les femelles de phénotype sensible pendant quelques générations à partir d'une femelle inoculée (L'Héritier et Hugon de Scoeux, 1947 ; L'Héritier, 1949). C'est cette transformation : passage du type non stabilisé au type stabilisé, que nous avons étudiée en détail dans le but de voir s'il n'existait que deux types bien distincts de mouches sensibles, comme nous le pensions, ou, au contraire, s'il y avait passage graduel d'un type à l'autre. Nous espérons, de plus, que cette étude nous permettrait de préciser la nature de l'état stabilisé qui réalise une si remarquable intégration du virus σ au matériel héréditaire de la drosophile.

ETUDE EXPÉRIMENTALE.

Nous avons réalisé des expériences tendant à la reconstitution d'une « souche pure sensible » à partir de mouches résistantes inoculées. Au cours de ces expériences, nous avons étudié des lignées pedigree de femelles sensibles dans le but de déceler le moment de l'apparition des mouches stabilisées et de vérifier la constance des propriétés d'une lignée stabilisée.

Tel que nous l'avons défini dans notre introduction, l'état stabilisé est caractérisé par l'ensemble des propriétés non pas seulement d'un individu, mais d'une lignée. Nous voulons savoir si les propriétés que nous avons énumérées sont inséparables dans un individu, de sorte que l'une quelconque d'entre elles pourrait servir à caractériser l'état stabilisé.

Nous ne pouvons donc provisoirement diagnostiquer de façon certaine l'état stabilisé que chez les femelles par l'étude des lignées qui en sont issues. C'est pourquoi nous avons décidé, dans les premières expériences, de nous limiter à l'observation des propriétés des femelles, remettant à plus tard l'étude de l'apparition des mâles transmetteurs dans la descendance des femelles non stabilisées et la discussion de leur assimilation à des mouches stabilisées. De plus, nous ne pouvions augmenter encore le volume des expériences, déjà fort important par suite de la nécessité de faire pondre individuellement un grand nombre de femelles dont une partie seulement, classées sensibles au cours du test du gaz carbonique, étaient utilisables.

Aucune technique nouvelle n'a été utilisée au cours de ces expériences ; nous renvoyons pour les techniques courantes : extraction, dosage du virus, test de la sensibilité, conditions d'élevage des drosophiles, à N. Plus (1954). Toutes les mouches

résistantes utilisées provenaient de la souche Oregon R. C., de type sauvage, qui nous sert de souche de référence.

EXPÉRIENCE I. — Le protocole de cette expérience est le suivant : inoculation de femelles résistantes, puis, au cours des générations successives : I, II, III, etc., étude individuelle d'un certain nombre de femelles sensibles. Les deux propriétés qui ont été systématiquement étudiées pour chaque femelle sont : a) sa valence ; b) le rendement moyen en virus de ses descendants. Le rendement des descendants nous a paru caractériser le germen de la femelle mieux que son propre rendement somatique.

Une quarantaine de femelles résistantes ont été inoculées avec une suspension de virus σ (2), et leur ponte recueillie le dix-septième jour après l'injection. A l'éclosion nous avons réalisé 189 croisements individuels ♀ vierge génération I \times ♂ résistant ; parmi ces femelles 11 seulement étaient sensibles ; 3 d'entre elles ont donné naissance uniquement à des descendants sensibles, et 8 à la fois à des résistants et à des sensibles (valences comprises entre 0 et 70 p. 100 — les valences sont toujours calculées sur une centaine de descendants au moins).

Nous avons croisé 15 filles de chacune des 3 femelles de valence 100 p. 100 avec des mâles résistants : toutes n'ont engendré que des sensibles. Deux lignées ont été observées encore pendant plusieurs générations et se sont toujours comportées comme des souches pures sensibles. Les trois mouches initiales étaient donc bien des femelles stabilisées.

Au contraire, les filles sensibles des femelles de valence non 100 p. 100 (donc certainement non stabilisées) étaient, comme les femelles sensibles de la génération précédente, de deux catégories : femelles de valence 100 p. 100, femelles de valence non 100 p. 100. Et ceci s'est produit génération après génération. Parmi les femelles non stabilisées, nous en avons choisi deux qui ont été le point de départ de deux lignées que nous avons conservées à l'état non stabilisé jusqu'à la génération V en sélectionnant chaque fois une mère de valence non 100 p. 100.

La figure 1 représente une partie de cette expérience ; nous n'avons figuré qu'une lignée stabilisée et une lignée non stabilisée. Un cercle plein symbolise une femelle ayant donné naissance uniquement à des descendants sensibles, et un cercle demi plein une femelle ayant donné naissance à la fois à des sensibles et à des résistants — seules les mères sensibles sont représentées — : les nombres inscrits sous les femelles sont les rendements moyens de leurs descendants (en milliers d'unités infectantes).

(2) Nous disposons à l'heure actuelle de plusieurs types de virus σ , description sommaire de leurs propriétés dans Duhamel, 1954.

On remarque, à la génération V, une femelle de valence non 100 p. 100 dans la lignée stabilisée. Nous avons dit que cet événement rare se produit cependant avec une certaine fréquence

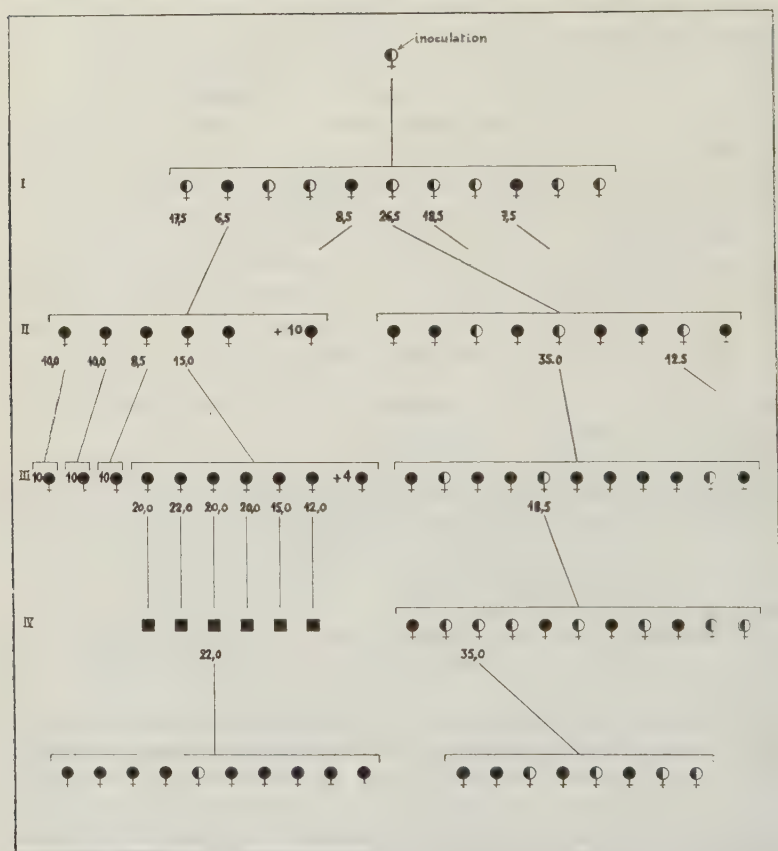


FIG. 4. — Étude d'une lignée stabilisée et d'une lignée maintenue non stabilisée pendant 5 générations. Cercle plein : femelle de valence 100 p. 100; cercle demi-plein : femelle de valence non 100 p. 100; carré plein : dix femelles sœurs ont été groupées et n'ont donné que des descendants sensibles.

qui n'a pas été étudiée — ici une femelle sur 126 —; cela ne change rien au diagnostic de la lignée.

L'ensemble des résultats concernant le deuxième caractère étudié : le rendement en virus des descendants des femelles, est résumé dans le tableau I. L'étude statistique n'a pas été faite sur

les rendements, mais sur les périodes d'incubation obtenues pour le dosage des extraits. En effet, cette donnée est le résultat immédiat de l'expérience, et, à l'intérieur d'une même souche, la distribution des périodes d'incubation (ou des logarithmes des rendements qui leur sont liés linéairement) est plus proche d'une distribution normale que celle des rendements eux-mêmes.

TABLEAU I. — Comparaison des rendements des descendants des femelles stabilisées et de ceux des descendants des femelles non stabilisées. Les limites de confiance de la période d'incubation, du logarithme du rendement et du rendement moyens sont indiquées dans les deux cas.

	q stabilisées	q non stabilisées	
I	9,5	8,2	STABILISEES
	9,2	7,6	m = 8,58
	9,3	8,1	$\sigma^2 = 0,233$
II	8,9	7,3	$\sigma_m = 0,10$
	8,9	8,6	$8,38 < \bar{t} < 8,78$
	9,2		$4,19 > \log N > 4,05$
	8,4		$15.500 > N > 11.000$
	8,6		
	8,5		NON STABILISEES
	8,3		m = 7,83
	8,3		$\sigma^2 = 0,210$
III	8,0	8,1	$\sigma_m = 0,15$
	7,9	7,4	$7,48 < \bar{t} < 8,18$
	8,0		$4,48 > \log N > 4,24$
	8,0		$30.000 > N > 17.500$
	8,4		
	8,7		
	8,6		
	8,5		
	8,8		
	8,6		
IV	7,9	7,3	Différence des moyennes:
	8,9	7,9	$0,75 \pm 0,187$

La période d'incubation moyenne correspondant aux femelles des lignées stabilisées est significativement plus longue que celle correspondant aux femelles non stabilisées. Les rendements

moyens, exprimés en logarithme du nombre d'unités infectantes, sont les suivants :

	σ	NB. DE DEGRÉS de liberté
Descendants de femelles stabilisées . . . 4,12	0,033	23
Descendants de femelles non stabilisées . . 4,36	0,05	8

Les rendements moyens obtenus par N. Plus (1954, 1955) sont :

Mouches de souche pure sensible . . . 4,24	0,10	8
Mouches sensibles de père 4,60	0,11	9
Mouches injectées avec 1 u. inf 4,38	0,12	9

On voit que les résultats concernant les mouches de souche pure sensible ou stabilisées sont tout à fait comparables, et que, d'autre part, la descendance des femelles non stabilisées a un rendement analogue à celui des injectées et des sensibles de père. Cependant, il ne faut peut-être pas s'attacher à retrouver une concordance trop précise entre deux expériences faites à plus d'un an d'intervalle, car la stabilité des souches de virus n'est que relative.

Quoi qu'il en soit, l'écart entre le rendement moyen des mouches stabilisées et celui des descendants des femelles non stabilisées est du même ordre de grandeur que l'écart qui sépare les mouches de souche pure sensible et les mouches tenant la sensibilité de leur père, bien que la descendance des femelles non stabilisées contienne certainement des mouches stabilisées qui diminuent le rendement moyen.

Conclusion et discussion de l'expérience I. — Les conclusions qui se dégagent de cette expérience sont les suivantes :

1° Le fait pour une femelle de posséder une valence 100 p. 100 entraîne la même propriété chez les femelles des générations suivantes. Le degré de certitude de cette conclusion est assez faible, puisque trois femelles de la génération I seulement ont été étudiées.

2° Il existe une différence significative entre le rendement moyen en virus d'une souche pure sensible et celui des descendants d'une femelle non stabilisée (le génotype et le « virotype » étant les mêmes par ailleurs) ; mais cette différence est seulement d'ordre statistique et ne permet pas, en général, de caractériser une femelle isolée.

D'autre part, nous n'avons pas vérifié que les femelles de valence 100 p. 100 apparues aux générations ultérieures dans les lignées non stabilisées donnaient naissance à une souche pure sensible, c'est-à-dire étaient stabilisées. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les femelles non stabilisées sont équivalentes à chaque génération.

Elles pourraient ne pas l'être, en particulier dans l'hypothèse suivante : on pourrait imaginer que deux types de virus possé-

dant des propriétés différentes — par exemple ce que nous pourrions appeler une « affinité différente pour le germen femelle » — auraient été mélangés dans l'injection initiale et ségrégeraient ensuite au hasard, par suite du passage dans chaque œuf d'un petit nombre seulement de particules. Dans ces conditions, les premières femelles non stabilisées pourraient donner naissance à des femelles stabilisées, alors que celles des générations ultérieures, contaminées uniquement par le virus possédant une faible « affinité pour le germen femelle », ne donneraient jamais que des descendants sensibles non stabilisés. Les propriétés différentes des deux états traduiraient seulement les propriétés des deux types de virus. Nous ne discuterons pas les incidences de cette hypothèse sur l'interprétation des résultats de N. Plus, puisque l'expérience II permettra de l'éliminer directement.

EXPÉRIENCE II. — Cette expérience a été conduite d'une manière analogue à la précédente en tenant compte des objections que nous venons de présenter.

La souche de virus utilisée est la souche ϕ isolée et caractérisée par l'un de nous. La courbe de dosage de ce virus (logarithme du titre en fonction de la période d'incubation) est différente de celle de σ_α : pour un même titre la période d'incubation est plus longue ; la valence des mâles des souches stabilisées σ_ϕ est faible et de l'ordre de 10 p. 100 ; enfin le virus ϕ envahit plus difficilement la lignée germinale des femelles injectées que le virus α : la transmission de la sensibilité commence plus tard et la valence des femelles n'atteint qu'un maximum voisin de 10 p. 100 ; les courbes de la figure 2 sont nettement différentes de celles publiées par N. Plus (1954, 1955) pour σ_α .

Cette dernière propriété correspond assez bien à celle que nous imaginions dans l'hypothèse précédente. Nous allons donc pouvoir directement mettre à l'épreuve cette hypothèse, et voir si, en prenant les femelles stabilisées, on sélectionne ou non un virus particulier. D'autre part, pour que l'extrait initial contienne un lot de virus aussi homogène que possible, nous l'avons obtenu en broyant les descendants d'une unique femelle.

La très faible valence des mâles stabilisés et des femelles injectées nous a conduits à simplifier l'expérience. Au lieu d'utiliser des femelles vierges, nous avons simplement laissé celles-ci se croiser avec leurs frères. L'apport possible de virus par le spermatozoïde n'influe certainement sur la valence des femelles sensibles que d'une manière négligeable (puisque nous classons ces valences en 100 p. 100 et non-100 p. 100) ; négligeable aussi son influence sur le rendement des descendants de ces femelles. Nous discuterons de l'importance de cette modi-

fication de la technique pour les autres points que nous aurons l'occasion d'étudier.

Dans la génération I, c'est-à-dire parmi les filles des femelles injectées, nous avons isolé 17 femelles sensibles dont une seule avait une valence 100 p. 100. Sa descendance a montré que cette femelle était certainement stabilisée; elle a été l'origine d'une lignée pure sensible que nous avons conservée.

D'autre part, nous avons gardé les filles de trois femelles non stabilisées de valences très diverses, qui ont donc constitué la génération II. Sur 38 femelles sensibles, 18 n'ont engendré que des sensibles; les filles de trois d'entre elles, mises à pondre, avaient toutes une valence 100 p. 100. Par conséquent, nous pouvons considérer que la fixation de la valence à 100 p. 100 est un événement génétiquement définitif, et qu'il correspond à la « stabilisation ». Nous continuons à vérifier ce fait chaque fois que nous voulons fabriquer une souche pure sensible: il suffit de trouver une femelle de valence 100 p. 100 pour assurer la réalisation d'une telle souche.

Nous n'avons pas étudié systématiquement les rendements en virus comme dans l'expérience précédente; mais les résultats, s'ils ne sont pas assez nombreux pour faire l'objet d'une étude statistique, confirment nettement le fait que les descendants d'une femelle non stabilisée ont un rendement moyen plus élevé que celui de la souche pure sensible correspondante. Par exemple, les extraits [3], [4], [5] ont donné les périodes d'incubation suivantes dont on a déduit les rendements (en log. du nombre d'u. inf.):

[3] : $\bar{t} = 8,9$	log. N = 4,0
[4] : $\bar{t} = 13,4$	log. N = 2,85
[5] : $\bar{t} = 12,1$	log. N = 3,2

L'extrait [3] correspond aux descendants d'une femelle non stabilisée de la génération II, l'extrait [4] aux descendants d'une femelle stabilisée, sœur de la précédente, et l'extrait [5] aux descendants d'une fille de la femelle stabilisée de la génération I.

Ces extraits ont été injectés à des lots de femelles résistantes dont les pontes ont été recueillies quotidiennement. Les courbes d'évolution de la valence de ces femelles sont dessinées sur la figure 2. Cette figure représente en outre les courbes d'évolution de la valence de femelles ayant subi l'injection [1] de l'extrait initial, [2] d'un extrait plus riche mais représentant le même échantillon de virus, car il a été obtenu par broyat de mouches injectées avec l'extrait [1]. La comparaison de ces cinq courbes montre clairement qu'en choisissant les femelles stabilisées on ne sélectionne pas un virus de propriétés différentes. Les seules divergences nettes que l'on puisse relever concernent le point d'apparition des premières sensibles; or, nous savons (N. Plus,

1954, 1955) que celui-ci dépend essentiellement du titre de l'extrait ; effectivement, pour les courbes [2] et [3] correspondant

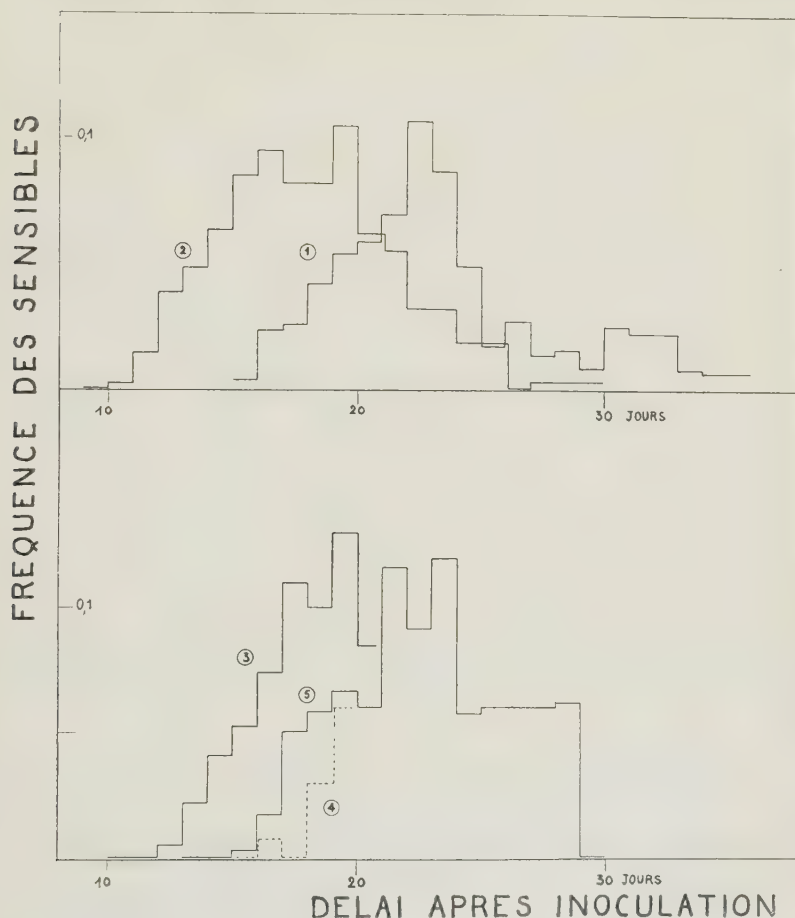


Fig. 2. — Évolution de la valence de femelles résistantes inoculées avec [1] l'extrait initial, [2] un extrait concentré après une "génération de multiplication" dans des mouches résistantes, [3] un extrait des descendants d'une femelle non stabilisée, [4] et [5] un extrait des descendants de 2 femelles stabilisées.

à un extrait environ dix fois plus concentré, le démarrage a lieu à dix jours, à quinze jours pour les autres. Il n'y a donc pas lieu de supposer que l'extrait initial était un mélange, à moins d'admettre que ce mélange soit resté stable dans ses proportions.

La figure 3 est un schéma qui résume l'ensemble de cette expérience. Nous n'avons pas représenté les diverses lignées étudiées, mais seulement les trois dont les descendants ont fourni les

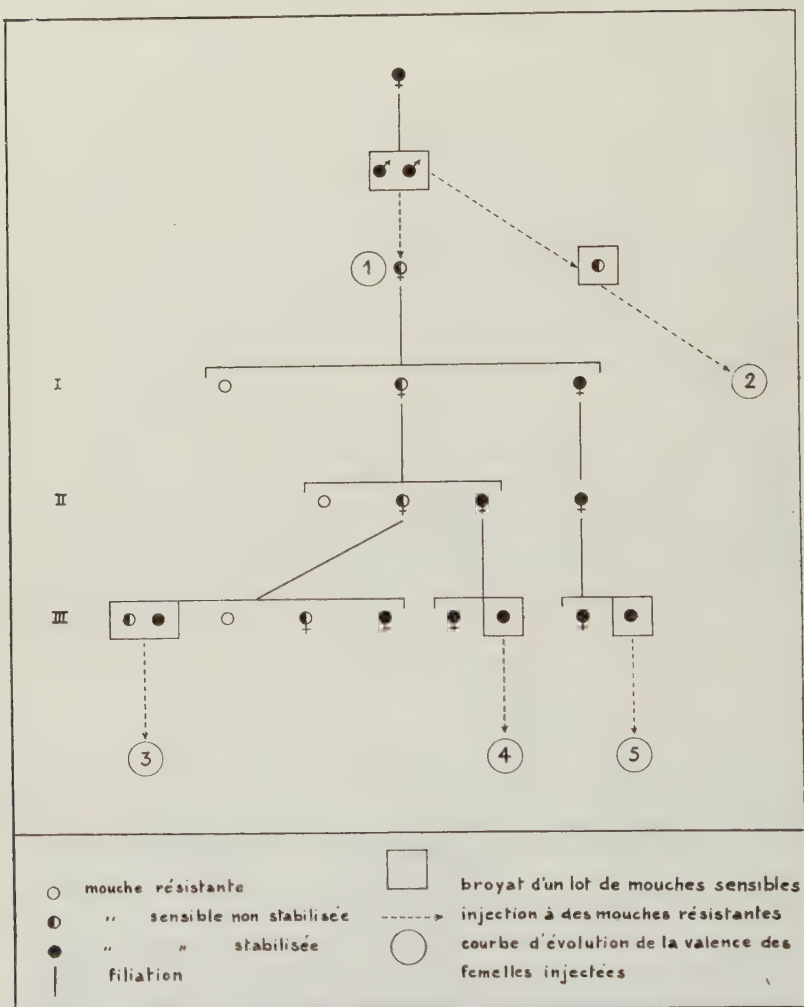


FIG. 3. — Représentation schématique de l'expérience II.

extraits [3], [4] et [5]. Les symboles utilisés dans la figure 1 pour représenter les femelles de valence 100 p. 100 et non-100 p. 100 ont été étendus aux mâles et femelles stabilisés ou non.

Arrivés à ce point de notre expérience, nous avons voulu la

compléter en étudiant l'évolution de la valence des femelles des lignées non stabilisées. Une des propriétés reconnues jusqu'à présent aux femelles inoculées et filles de père sensible — qui sont des cas particuliers de femelles non stabilisées — est l'évolution particulière de leur valence suivant une sorte de courbe en cloche dont la descente seule est observable dans certains cas. Il importait donc de montrer que ce phénomène est général et s'observe régulièrement chez toute femelle non stabilisée.

Quatre-vingt-neuf femelles de la génération III, filles de deux femelles non stabilisées, mises à pondre individuellement, ont été repiquées tous les trois ou quatre jours, du 14 février au 2 mars. Au cours du test du 2 mars, 19 femelles se sont révélées sensibles, leurs pontes ont été conservées ; les pontes des autres femelles, résistantes ou mortes avant le test, ont été éliminées. Le test de la première série de descendants a montré que, parmi les femelles sensibles, 10 avaient une valence non 100 p. 100 et 8 une valence 100 p. 100 (1 ♀ stérile). Ces dernières ont conservé une valence constante pendant les quinze jours de l'expérience et n'ont donné naissance qu'à des sensibles ; ces femelles étaient certainement stabilisées.

Chez 9 femelles de valence non 100 p. 100, celle-ci a diminué très rapidement jusqu'à être nulle vers le dixième jour de l'expérience. Le tableau II et la figure 4 montrent l'évolution de la valence de deux de ces femelles : les ♀ 14-2-5 et 14-2-46.

TABLEAU II. — Evolution de la valence de 3 femelles non stabilisées de la génération III : ♀ 14-2-5 et ♀ 14-2-46 non stabilisées typiques, ♀ 3-10-5 femelle mosaïque.

dates des pontes	I4.II	I6	I9	23	25	2.III	Total
♀ 14-2-5	s	8	5	I	0	0	0
	r	44	98	101	65	78	58
	% de s	15,4	4,8	1,0			
♀ 14-2-46	s	22	25	I	0	0	0
	r	22	54	92	68	III	13
	% de s	50,0	31,6	1,1			
♀ 3-10-5	s	13	27	36	28	30	7
	r	19	55	61	51	54	26
	% de s	40,5	32,9	37,1	35,4	35,7	21,2
							34,6

Au contraire, la valence de la dixième femelle n'a manifesté aucune tendance à évoluer dans quelque sens que ce soit : le test d'homogénéité de l'ensemble des pontes de la femelle 3-10-5

donne un $\chi^2 = 3,5$ pour 5 degrés de liberté, soit une probabilité d'environ 60 p. 100 de trouver des pontes plus hétérogènes. Si donc les 9 premières femelles sont des non-stabilisées typiques et confirment la constance de l'association entre les diverses propriétés de l'état non stabilisé, la dernière semble contredire cette hypothèse. En effet, il semble que nous ayons là un type inter-

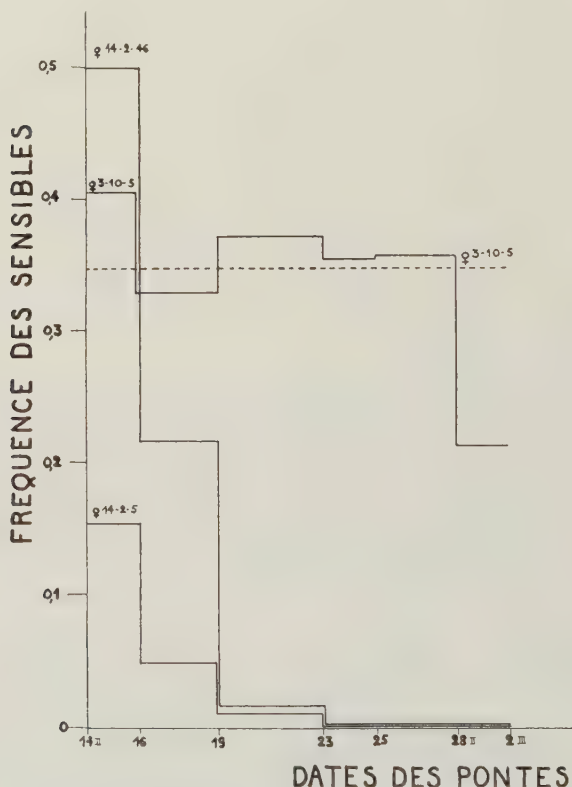


FIG. 4 — Évolution de la valence de 3 femelles non stabilisées de la génération III (voir Tableau II).

médiaire groupant des propriétés attribuées à l'état stabilisé et des propriétés de l'état non stabilisé.

Nous avons étudié spécialement cette femelle. Nous avons croisé et mis à pondre individuellement la totalité de ses filles à partir de la ponte du 16 février, soit 201 femelles, dont 71 ont été reconnues sensibles. Ces 71 femelles se sont réparties comme suit : 1 stérile, 3 demi-stériles (ont eu seulement une dizaine de

descendants — notons que dans les 3 cas ceux-ci étaient tous sensibles), 1 n'a donné naissance qu'à des résistants et était vraisemblablement une mouche résistante considérée comme sensible par erreur, enfin 62 n'ont donné naissance qu'à des sensibles et 4 à la fois à des sensibles et à des résistants.

On voit que la grande majorité (94 p. 100) des filles sensibles sont des mouches stabilisées. Nous avons donc formulé l'hypothèse suivante : la femelle 3-10-5 serait une mosaïque germinale de tissus stabilisés et non stabilisés. La fraction non stabilisée du germen se comporte comme le germen des autres femelles de valence non 100 p. 100 : c'est-à-dire produit des sensibles (stabilisées et non stabilisées) au début de la vie de la mouche, puis ne donne naissance qu'à des résistantes. Au contraire, la fraction stabilisée du germen se comporte comme celui des femelles de valence 100 p. 100 et ne produit que des descendants sensibles, eux-mêmes stabilisés. Ce sont ces derniers descendants sensibles que nous aurions observés.

Une telle hypothèse devrait se traduire par une diminution suivie d'une stabilisation de la valence de la femelle mosaïque. En fait, les observations réalisées sur la femelle 3-10-5 n'excluent pas une évolution de ce type. D'une part, les valences maxima des femelles non stabilisées sont très variables et quelquefois très faibles (10 à 5 p. 100), la diminution de la valence peut donc être peu nette et masquée par les erreurs d'échantillonnage. D'autre part, l'âge des femelles de la génération III croisées le 14 février n'était pas exactement déterminé, il variait de deux à sept jours après l'émergence imaginale ; cette baisse aurait peut-être été manifeste si nous avions pu étudier les pontes des jours précédents.

Ce dernier point, par son imprécision, diminue la valeur de nos résultats. Le fait que les femelles ont été croisées avec leurs frères introduit aussi un léger doute. En effet, quelques sensibles peuvent provenir d'ovules infectés par le spermatozoïde, et l'on sait que la fréquence des sensibles que pond une femelle fécondée par un mâle transmettant la sensibilité diminue au cours du temps (Sigot, 1953). Néanmoins, il est impossible de rendre des mâles de valence inférieure à 10 p. 100 responsables du niveau et de l'évolution de la valence des femelles 3-10-5 et 14-2-46.

Nous avons répété l'expérience de repiquage tous les trois jours avec des femelles de la génération VII, vierges et croisées individuellement avec des mâles résistants vingt-quatre heures après l'émergence imaginale. Nous n'avons conservé que les pontes des 4 femelles qui ont donné à la fois des sensibles et des résistants à la première ponte ; un test à la fin de l'expérience a montré qu'elles étaient bien toutes de phénotype sensible. Les résultats ont confirmé entièrement les précédents :

3 femelles étaient des non-stabilisées typiques ; leur valence, très variable à la première ponte (13, 16 et 40 p. 100), a subi une chute rapide (six à huit jours) puis est restée nulle jusqu'à la fin de l'expérience (dix-huit jours).

La quatrième femelle était analogue à la femelle 3-10-5 dont nous avons discuté longuement l'interprétation. Comme le montre le tableau III, sa valence est restée constante aux environs de 50 p. 100. Cependant, le test d'homogénéité général donne $\chi^2 = 16,8$ significativement trop grand (pour 6 degrés de liberté la

TABLEAU III. — Pontes successives
d'une femelle mosaïque de la génération VII.

Jours après émergence	1	4	7	9	12	15	18	21	TOTAL
s	26	39	20	45	41	27	31		229
r	17	17	34	57	34	28	23		210
% de s	60,5	69,6	37,0	44,1	54,7	49,1	57,4		52,2 χ^2 16,8
				s	164				
				r	176				
				%	48,2	χ^2 6,45			

probabilité correspondante est 1 p. 100) ; en supprimant les deux premières pontes qui contiennent trop de sensibles, on obtient un ensemble homogène ($\chi^2 = 6,45$, soit, pour 4 degrés de liberté, une probabilité d'environ 20 p. 100). Ces résultats sont donc en bon accord avec l'interprétation que nous avons donnée pour la femelle 3-10-5.

Conclusion de l'expérience II. — Cette expérience confirme les conclusions de l'expérience I. Nous pouvons donc considérer comme définitivement établi que :

1° Les femelles de valence 100 p. 100 sont toujours des mouches stabilisées.

2° Il existe une différence statistiquement significative entre les rendements moyens en virus des mouches stabilisées et des non stabilisées.

Elle apporte en outre la précision suivante :

3° La valence des femelles non stabilisées décroît rapidement et reste ensuite strictement nulle.

Ces trois points sont conformes aux hypothèses que nous avançons dans l'introduction, c'est-à-dire que les propriétés caractéristiques de l'état stabilisé sont indissociables et qu'il n'existe que deux types de mouches sensibles.

4° Mais cette expérience montre l'existence d'une troisième

catégorie de femelles sensibles. Nous avons proposé une interprétation qui considère ces femelles intermédiaires comme des mosaïques germinales.

EXPÉRIENCE III. — Nous avons vu que les mâles d'une souche pure sensible transmettent la sensibilité à une partie de leur descendance, alors que les mâles inoculés ou tenant la sensibilité de leur père ne la transmettent pas du tout. Il nous a semblé logique de penser que les mâles transmetteurs qui apparaissent dans une lignée non stabilisée sont des mouches stabilisées. Or le diagnostic de l'état stabilisé est possible chez la femelle par l'étude de sa descendance, alors qu'il ne l'est pas chez le mâle qui ne transmet jamais l'état stabilisé. Aussi le seul moyen de prouver l'exactitude de l'hypothèse ci-dessus est-il de montrer que la fréquence d'apparition de ces mâles transmetteurs est la même que la fréquence d'apparition des femelles de valence 100 p. 100 que nous avons reconnues être des femelles stabilisées.

Cette étude est l'objet de l'expérience III. Nous avons choisi d'étudier directement la descendance de femelles inoculées.

Le protocole de l'expérience est le suivant : injection de femelles résistantes avec un extrait provenant d'une souche σ_z , puis, dans la descendance, prélèvement de mâles et de femelles pour déterminer leur valence. Nous avons fait trois prélèvements :

A : au début de l'apparition des sensibles, soit le quatorzième jour après l'injection ;

B : vers le maximum de la courbe en cloche dissymétrique caractéristique de l'évolution de la valence des femelles inoculées, le vingt-deuxième jour ;

C : le trente-quatrième jour après l'injection, lorsque la fréquence des sensibles eut nettement diminué.

Nous avons prélevé en A et C 400 ♂ et 400 ♀, en B 200 seulement.

Les femelles sont croisées individuellement avec des mâles résistants et soumises au test du gaz carbonique après ponte suffisante (sept à dix jours) ; la valence des femelles sensibles est toujours calculée sur 100 descendants au moins. Au contraire, puisqu'il importait seulement de savoir s'ils transmettaient ou non la sensibilité, les mâles ont pu être groupés par 4 pour les lots A et C et par 2 pour le lot B ; ils ont été croisés respectivement avec 8 ou 4 femelles vierges résistantes. Après le test des mâles (vers le cinquième jour), les bouteilles ayant contenu 1 ou quelquefois 2 mâles sensibles étaient conservées, les femelles y pondaient encore quelques jours ; finalement, les descendants, au nombre de 500 à 1 000, ont été soumis au test à l'éclosion,

La figure 5 représente l'évolution de la valence des femelles inoculées ; elle est tout à fait comparable qualitativement à ce que nous connaissons (N. Plus, 1954, 1955). Nous ne nous attacherons pas à discuter les différences quantitatives (le maximum est, ici, de l'ordre de 20 p. 100 seulement), mais parmi les facteurs non contrôlés à incriminer, l'évolution de la souche de

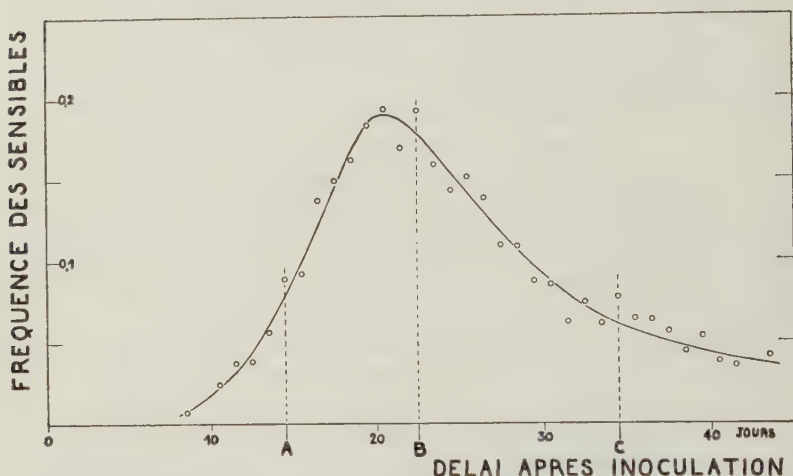


FIG. 5. — Évolution de la valence des femelles résistantes inoculées dans l'expérience III; A, B, C : niveaux des prélèvements de descendants étudiés.

virus (par la fixation de mutants nouveaux ou la modification des proportions de mutants existants) est probablement le plus important. Cette remarque ne diminue en rien la validité des conclusions que nous pourrions tirer de cette expérience.

Les résultats d'ensemble de l'étude individuelle des mâles et des femelles sont présentés dans le tableau IV. Dans la première colonne, les fréquences de sensibles sont lues sur la courbe de la figure 5 ajustée à vue. Les nombres de mâles transmetteurs de la colonne 7 tiennent compte des cas où il y avait 2 mâles sensibles dans la même bouteille. Les deux dernières colonnes représentent l'écart de la fréquence des mâles transmetteurs avec celle des femelles de valence 100 p. 100, l'erreur standard de cet écart et la probabilité d'avoir un écart supérieur par pur hasard dans les trois lots A, B et C.

On voit qu'aucun des 3 écarts n'est significatif ; par conséquent, dans chaque lot considéré isolément, les échantillons des mâles et des femelles pourraient correspondre à deux tirages au sort dans deux urnes contenant les mêmes fréquences de mouches stabilisées et non stabilisées. Mais l'écart est systématiquement

dans le même sens, et sa valeur moyenne 0,17 égale environ à trois fois son erreur standard, est nettement significative. Il n'est donc pas douteux que la fréquence des mâles transmetteurs est légèrement supérieure à la fréquence des femelles de valence 100 p. 100.

L'expérience précédente nous a appris qu'il existe des femelles intermédiaires que nous avons été amenés à considérer comme des mosaïques germinales de tissus stabilisés et non stabilisés. Si cette hypothèse est exacte, il n'y a aucune raison pour ne pas

TABLEAU IV. — Comparaison de la fréquence d'apparition des femelles de valence 100 p. 100 et de celle des mâles transmetteurs dans les trois lots A, B, C.

	fréq. des sensibles	nb. de ♂ et ♀ étudiés	nb. de ♀ sensibiles	nb. de ♀ valence 100 %	fréq. des ♀ sens. 100 % (p_g)	nb. de ♂ sensibiles	nb. de ♂ transmetteurs	fréq. des ♂ sens. transmetteurs (p_d)	dif. des fréq. $p_d - p_g$	probab. d'un écart supérieur
A	7,8 %	400	35	7	20 %	39	15	39,0 %	0,19 $\sigma = 0,1$	6 %
B	18,5 %	200	34	19	55,9 %	32	22	68,6 %	0,127 $\sigma = 0,12$	29 %
C	6,0 %	400 ♂ 385 ♀	32	13	40,5 %	32	19	59,5 %	0,19 $\sigma = 0,12$	12 %
									0,17 $\sigma = 0,067$	< 2 %

l'étendre aux mâles. Il doit donc exister, en plus des mâles totalement stabilisés, des individus dont une partie seulement des cellules germinales sont stabilisées. S'il en est bien ainsi, ces mâles se sont trouvés, au cours de notre expérience, classés dans la catégorie des transmetteurs, venant ainsi s'ajouter aux stabilisés complets.

Cependant, il est infiniment probable que la valence d'un certain nombre au moins de ces mâles doit être nettement plus faible que celle de leurs frères totalement stabilisés. Pour tenter de mettre en évidence leur présence, nous avons comparé la distribution des valences des mâles transmetteurs avec celle d'un lot témoin de mâles stabilisés ; ces distributions figurent sur le tableau V où les valences sont groupées en classes de 10 en 10 p. 100.

La technique de mettre plusieurs mâles dans une même bouteille, utilisée pour simplifier l'expérience, introduit évidemment une imprécision assez considérable. Nous avons estimé la valence du mâle sensible présent dans une bouteille, en multipliant la fréquence des sensibles dans la descendance par le nombre de pères vivants au moment où ils ont été soumis au test (il y a peu

de chances qu'un mâle mort au bout de cinq jours ait participé à la fécondation des femelles).

TABEAU V. — Distribution des valences des mâles transmetteurs dans les lots A, B, C et dans le lot témoin.

	A	B	C	total	témoin
100 %					
90 %	1	7	1	9	9
80 %	1	2	3	6	11
70 %	1		2	3	8
60 %	1	2	2	5	12
50 %	3	4	2	9	11
40 %	3	3	3	9	1
30 %		3	1	4	
20 %	1		3	4	
10 %	1	1	1	3	
0	3		1	4	
total	10 + 5	21 + 1	14 + 5	45 + 11	52

D'autre part, il eût été préférable de comparer les valences de nos mâles transmetteurs à celles d'un lot de fils des femelles stabilisées; malheureusement, lors de l'analyse de cette expérience tous les descendants avaient été jetés. Nous avons dû refaire

une expérience sommaire avec le même matériel et reconstituer quelques lignées stabilisées à partir de mouches résistantes inoculées. Cinquante-deux mâles provenant de 5 femelles stabilisées (10 ou 11 ♂ par lignée) constituent le lot témoin.

On voit que, parmi les témoins, il n'y a pas de valence inférieure à 40 p. 100, alors que, chez les mâles étudiés, 11 valences sur 56 sont inférieures à 30 p. 100. Il y a donc bien une quantité anormale de valences faibles ou très faibles ; et, malgré les réserves présentées ci-dessus sur la validité du témoin, la comparaison est parfaitement concluante en faveur de l'hypothèse que nous avons faite. Pour faire largement la part des erreurs diverses, nous avons pris 30 p. 100 comme limite inférieure des valences des mâles totalement stabilisés (elle correspond d'ailleurs dans les trois lots à une coupure plus ou moins nette dans les valences). Les nombres de mâles stabilisés : 10, 21, 14 pour les lots A, B, C respectivement, donnent alors des fréquences tout à fait comparables à celles des femelles de valence 100 p. 100.

Conclusion de l'expérience III. — Nous espérons, dans cette expérience, montrer que la fréquence des mâles transmetteurs est la même que celle des femelles de valence 100 p. 100. Nous avons, au contraire, mis en évidence un écart nettement significatif ; cet écart est dû à la présence, parmi les mâles transmetteurs, de mâles de valence faible.

La présence de ces mâles, qui nous paraissent manifestement correspondre aux femelles intermédiaires mises en évidence dans l'expérience II, renforce considérablement l'hypothèse qu'il s'agit là de mosaïques germinales de tissus stabilisés et non stabilisés. La fréquence de ces mouches mosaïques est loin d'être négligeable, puisque les expériences II et III permettent de l'évaluer à 20 p. 100 des mouches sensibles non totalement stabilisées (2 ♀ mosaïques et 11 non stabilisées ; 11 ♂ mosaïques et 47 non stabilisés).

CONCLUSION ET DISCUSSION DE L'INTERPRÉTATION DE L'ÉTAT STABILISÉ.

Les différences entre les mouches de souche pure sensible et celles qui sont devenues sensibles après une injection sont nettes et évidentes. Elles ne peuvent pas s'interpréter par une simple différence de degré entre l'invasion par le virus de ces deux types de mouches ; elles nous obligent à supposer l'existence de deux relations différentes entre le virus et son hôte (N. Plus, 1955). Nous voulions généraliser les résultats de N. Plus et montrer qu'il n'existe que deux types bien distincts de drosophile sensible ; nous espérons, en étudiant le passage de l'un à l'autre, définir plus précisément ces deux modes d'interaction virus-hôte que nous avons désignés sous le nom d'état stabilisé et d'état non stabilisé.

Nous avons effectivement montré l'existence de deux types de mouches sensibles conformes aux types prévus, mais, en outre, nos expériences mettent en évidence un type intermédiaire. Les propriétés des mouches de ce type nous ont amenés à les considérer comme des mosaïques germinales. Cette dernière hypothèse correspond, en fait, à la distinction de deux *états cellulaires* que nous pouvons toujours appeler stabilisé et non stabilisé. L'unité adoptée en première approximation : la mouche, est trop grande, l'hôte véritable du virus σ est la cellule de *Drosophile*.

Si les mouches sont aussi souvent d'un type homogène, c'est que le passage de l'état non stabilisé à l'état stabilisé, que nous pouvons appeler stabilisation sans préjuger de sa nature, intervient généralement au moment où l'individu mouche est une cellule unique, c'est-à-dire au niveau de l'œuf. L'existence de mouches mosaïques montre que cette stabilisation peut cependant se produire un peu plus tard, au moment de l'isolement des cellules germinales primordiales. Mais il semble qu'elle ne puisse pas se produire ensuite, du moins dans la lignée germinale, puisque les mâles injectés ne transmettent jamais la sensibilité, et que la valence des femelles non stabilisées devient et reste effectivement nulle.

On peut donc penser que la stabilisation est favorisée par les conditions très particulières de l'œuf, ou même qu'elle est conditionnée par la présence de particules σ suffisamment tôt dans le plasma polaire. La contamination plus ou moins précoce ou massive des œufs pondus par les femelles non stabilisées pourrait alors expliquer les diverses catégories de descendant's sensibles obtenues. On peut pousser encore plus loin cette hypothèse, et montrer qu'elle pourrait rendre compte de la continuité génétique de l'état stabilisé. On peut penser que les œufs des femelles stabilisées seraient toujours contaminés suffisamment tôt et massivement pour que le plasma polaire soit toujours atteint. Nous avons là une interprétation de la stabilité génétique des souches stabilisées sans avoir à admettre une continuité dans les propriétés du complexe cellule-virus, puisqu'il y aurait stabilisation à chaque génération. Cette hypothèse ne rend pas compte de l'existence de différences d'ordre somatique entre les deux types de mouches (rendement en virus). Certaines de ces différences se manifestent très précocement, comme l'a montré N. Plus (1954, 1955) en comparant les courbes de multiplication du virus chez les mouches de souche pure sensible et chez les sensibles de père. L'hypothèse échoue complètement dans l'interprétation de la stabilité de la souche σ . Nous imaginons donc plus volontiers une véritable continuité de l'état stabilisé qui est transmis d'une cellule à ses filles, et d'une mère à ses œufs. Ceci nous amène donc à étendre aux cellules somatiques la notion d'état stabilisé.

Essayons maintenant d'imaginer ce que peut être cet état stabilisé. Il se manifeste essentiellement :

- 1° Par une diminution du rendement somatique ;
- 2° Par une véritable liaison entre le virus et les cellules de la lignée germinale (alors que chez les femelles non stabilisées, ces cellules ne sont infectées que d'une manière provisoire).

Des faits susceptibles de nous aider à interpréter l'état stabilisé ont été mis en lumière par l'étude d'une souche de drosophile particulière, dite souche ρ , provenant d'une souche sensible, et qui sera étudiée longuement dans le prochain mémoire de cette série ; son existence a déjà été signalée par L'Héritier (1951). Les mouches ρ , en général, ne sont pas sensibles et ne contiennent pas de virus infectieux ; mais cela se produit occasionnellement sans retentir sur leur descendance. Les mouches ρ résistantes manifestent une sorte d'immunité, d'ailleurs relative, vis-à-vis de l'inoculation du virus σ . Ces propriétés sont transmises uniquement et régulièrement par hérédité maternelle. Nous avons conclu, avec un haut degré de vraisemblance, à la présence dans ces mouches d'une forme masquée (3) du virus σ . Cette forme masquée ne se manifeste que par son interférence avec la forme normale ; la régularité de sa transmission, comparable à celle de σ dans les souches stabilisées, nous oblige à imaginer qu'elle est liée au cytoplasme, intégrée au milieu cellulaire normal.

La similitude des deux situations : celle des souches ρ et celle des souches stabilisées, nous a conduits à penser que la liaison du virus avec le cytoplasme cellulaire est du même type dans les deux cas (4) ; donc, dans cette position le virus σ lui-même doit être sous une forme masquée. L'existence de cette forme masquée est rendue probable par le fait que le rendement des mouches stabilisées est plus faible que celui des mouches non stabilisées.

L'interprétation de l'état stabilisé que nous imaginons est donc rigoureusement semblable à celle de l'état lysogène des bactéries telle qu'elle se dégage des travaux de Lwoff et collaborateurs. La capacité potentielle de produire des phages est transmise d'une bactérie à ses filles et se manifeste occasionnellement. La capacité potentielle de produire du virus σ est transmise d'une cellule à ses filles ; lorsqu'elle se manifeste (accidentellement ou peut-

(3) Avec Luria (1953) nous adopterons la terminologie virus masqué pour une forme non infectieuse, réservant le terme latent pour une infection virale sans symptômes.

(4) Cette similitude a été confirmée par une expérience non publiée de A. Ohanessian-Guillemain (communication personnelle) : l'introduction du gène réfractaire (Guillemain, 1953) dans une lignée et dans une lignée stabilisée amène, lorsque le gène est homozygote, la perte du caractère ρ et la destruction de l'état stabilisé.

être automatiquement dans certaines lignées somatiques), du virus infectieux est fabriqué puis expulsé ; la cellule, qui n'est pas tuée, reste alors libre de virus mais incapable de supporter un nouveau cycle de multiplication. Nous croyons que la libération de la lignée germinale chez les femelles non stabilisées est l'image parfaite et la conséquence de cette guérison spontanée des cellules qui ont subi le cycle de multiplication normal ou « cycle lytique ».

Une drosophile sensible stabilisée est tout à fait analogue à un tube de culture ensemencé de bactéries lysogènes, dont le rendement en phages est très inférieur au rendement du même tube ensemencé avec la souche de bactéries sensibles, puis infecté par le phage. Une mouche φ peut être considérée comme analogue à un tube de culture d'une souche lysogène « défective », dont le rendement sera généralement nul, et qui ne conservera donc que l'immunité vis-à-vis d'une infection par le phage homologue (5).

Nous allons essayer d'aller plus loin dans la compréhension de la liaison virus-cellule-hôte de l'état stabilisé ; nous serons amenés à souligner les limites de l'analogie avec l'état lysogène des bactéries.

Les travaux sur le bactériophage ont montré l'existence, au cours du cycle lytique, de deux formes : une forme infectieuse et une forme de multiplication non infectieuse (forme végétative). Les travaux sur le virus σ permettent de penser qu'il a un cycle analogue (N. Plus, 1954, 1955). En outre, les bactéries lysogènes hébergent une troisième forme, dite prophage, non infectieuse également et étroitement liée au matériel génétique de la bactérie (Wollman, 1953 ; on trouvera un exposé complet des hypothèses actuelles sur les bactéries lysogènes dans Lwoff, 1953, ou Jacob, 1954). Une interprétation calquée sur celle-ci nous entraînerait à de grandes difficultés. En effet, la particule non infectieuse dont nous supposons l'existence dans les cellules stabilisées (appelons-la provirus par analogie avec le prophage) n'est certainement pas liée au matériel génétique chromosomique qu'il est possible de changer par l'apport des mâles en restant dans la même lignée femelle stabilisée. Il est même difficile d'admettre que le provirus soit unique et synchronisé avec la multiplication cellulaire à cause de l'irrégularité de la transmission de la sensibilité par les mâles stabilisés.

Le provirus σ existe donc en un certain nombre d'exemplaires, constant en moyenne, dans la cellule stabilisée. La seule différence

(5) Cette dernière analogie nous a été suggérée par Elie Wollman au cours d'une séance de la Société Française de Génétique consacrée à : *Parallèle entre bactéries lysogènes et drosophiles sensibles au CO_2* .

Ce parallèle a déjà été développé, notamment par L'Héritier (1954) et Jacob (1954).

avec le virus végétatif est que ce dernier a un cycle complet et donne des virus infectieux. Mais si les deux formes étaient intrinsèquement différentes, il faudrait admettre qu'elles se transforment bien facilement l'une dans l'autre, puisque les mouches stabilisées contiennent toujours du virus infectieux et que le provirus du spermatozoïde infectant un œuf se transforme automatiquement en virus végétatif. Nous considérons donc qu'il n'y a aucune raison, actuellement, de distinguer ces deux formes.

Nous croyons pouvoir expliquer les deux voies offertes au virus végétatif : cycle normal et état stabilisé, par une hypothèse du type « équilibre de flux » (Delbrück, 1949). Il est clair qu'une particule autoreproductible indépendante, qui entre en compétition avec les éléments normaux de la cellule, peut atteindre un niveau d'équilibre parfaitement stable, si le prélèvement fait sur les métabolites est compatible avec la survie et le fonctionnement physiologique normal de la cellule. Cet équilibre est alors du même ordre que celui qui existe entre les constituants autoreproductibles normaux de la cellule et on peut considérer la particule comme intégrée à la cellule, c'est-à-dire comme un véritable plasmagène. C'est alors le cycle lytique qu'il s'agit d'expliquer. La mise en équation de quelques hypothèses simples où la multiplication des particules est limitée par un substrat, produit et utilisé par la cellule, montre qu'il existe un état d'équilibre où le nombre de particules et la concentration du substrat sont déterminés. Mais, en outre, elle montre que, si l'on introduit une particule dans une cellule vierge où la concentration du substrat est plus élevée, cet équilibre n'est atteint qu'après des oscillations (analogues à celles des systèmes imaginés par Volterra, 1931) où le nombre des particules peut dépasser largement le niveau d'équilibre. Il suffit alors d'imaginer que la réaction de maturation des particules végétatives en virus infectieux s'amorce lorsqu'un certain niveau de particules est atteint, pour expliquer le cycle lytique normal après la pénétration d'un virus α dans une cellule vierge.

Il nous paraît inutile, dans l'état actuel de nos connaissances, de préciser davantage cette théorie ; ces indications suffisent à montrer comment on peut concevoir la dualité équilibre symbiotique-virose normale, sans faire appel à la fixation d'un provirus sur un site spécifique de l'hôte. Cette théorie explique les faits d'une manière satisfaisante ; elle nous paraît très compatible avec les idées de Visconti et Delbrück (1953) sur la multiplication des virus (nous nous sommes très largement inspirés du modèle fourni par le phage végétatif). Soulignons, enfin, que notre interprétation ne diminue en rien la valeur de celle de Jacob, Lwoff et Wollman pour les bactéries lysogènes ; il est parfaitement concevable que deux situations aussi analogues aient un mécanisme

différent, étant donné l'importance des dissemblances entre les deux hôtes. Quoi qu'il en soit, l'intérêt fondamental de l'étude de la sensibilité au gaz carbonique et de celle des bactéries lysogènes est qu'elles montrent l'existence d'une possibilité d'intégration cellulaire des virus ; L'Héritier (1955) discute de l'extension probable d'un tel phénomène et des possibilités d'explication qu'il apporte pour de nombreux cas de virus masqués et d'hérédité cytoplasmique.

RÉSUMÉ.

L'objet de ce mémoire est l'étude de l'apparition de mouches ayant les propriétés des drosophiles de souche pure sensible dans les lignées provenant de femelles inoculées.

Cette étude montre l'existence de deux états cellulaires : l'état stabilisé et l'état non stabilisé, représentant deux modes d'interaction entre le virus et son hôte. Le dernier état correspond au cycle de multiplication classique d'un virus ; le premier, au contraire, représente un type nouveau d'interaction qui réalise une véritable intégration du virus à la cellule ; ses analogies avec le système prophage-bactérie sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

- M. DELBRÜCK. Discussion de l'article de Beale et Sonneborn dans *Unités biologiques douées de continuité génétique*, C. N. R. S., Paris, 1948.
- C. DUHAMEL. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1157-1159.
- L. GOLDSTEIN. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1949, **83**, 177-188.
- L. GOLDSTEIN. *Thèse Paris*, 1951.
- A. GUILLEMAIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 1085-1086.
- F. JACOB. *Thèse Paris*, 1954.
- PH. L'HÉRITIER. Dans *Unités biologiques douées de continuité génétique*, C. N. R. S. Paris, 1949.
- PH. L'HÉRITIER. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, 1951, **16**, 99-112.
- PH. L'HÉRITIER. Dans *Quelques problèmes actuels de virologie*, Masson, Paris, 1954.
- PH. L'HÉRITIER. *Année biol.*, 1955 (sous presse).
- PH. L'HÉRITIER et F. HUGON DE SCOEUX. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1947, **81**, 70-91.
- PH. L'HÉRITIER et G. TEISSIER. *Pub. Lab. E. N. S. Paris, Biol.*, 1945, **1**, 35-76.
- S. E. LURIA. *General virology*, Wiley and Sons, New York, 1953.
- A. LWOFF. *Bact. Rev.*, 1953, **17**, 270-337.
- N. PLUS. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1954, **88**, 248-293.
- N. PLUS. *Ces Annales*, 1955, **88**, 347.
- A. SIGOT. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1953, **87**, 336-413.
- N. VISCONTI et M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1953, **38**, 5-33.
- V. VOLTERRA. *Leçons sur la théorie mathématique de la lutte pour la vie*, Paris, 1931.
- E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 281-293.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 3 Février 1955.

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE D'UN FOYER DE BOTULISME BOVIN DÙ A *CL. BOTULINUM C.*

par A.-R. PRÉVOT, R. SILLIOT et J. PROUTÉ.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

Nous avons pu, au cours de ces derniers mois, étudier l'origine et l'évolution d'un foyer de botulisme bovin, survenu à Saint-Martin-sur-Oreuse (Yonne) dans un troupeau de vaches laitières au pâturage, recevant en plus du maïs, de la farine d'orge et du fourrage sec.

Sur 7 vaches, 6 présentèrent pendant deux à trois jours des signes d'indigestion, arrêt de la rumination, silence du rumen, constipation, crottes moulées, luisantes. Toutes les vaches sont apyrétiques. Puis une vache tombe paralysée en décubitus sterno-costal, restant apyrétique, et meurt après une maladie de cinq jours. A l'autopsie, légère congestion viscérale, hypertrophie du foie, vésicule biliaire distendue, énorme.

Une deuxième vache présente, quelques jours après, des signes de paralysie extensive, avec une paralysie de la langue et du pharynx. La langue pend hors de la bouche, longue de 20 cm, elle est molle et flasque. Ce tableau clinique fait poser le diagnostic de botulisme bovin. Un traitement par sérum antibotulique C + D est institué sur toutes les vaches malades. Néanmoins, après une nette amélioration, la vache paralysée meurt (la langue est rentrée dans la bouche). L'autopsie est faite dans l'heure qui suit la mort et on trouve le même tableau anatomo-pathologique avec foie hypertrophié et jaune par endroits, vésicule biliaire très volumineuse. Les autres vaches guérissent après des alternatives d'amélioration et d'aggravation (une vache d'aspect

rachitique et en très mauvais état général avant la maladie meurt trois semaines après).

Le foie de la deuxième vache autopsiée a été examiné à l'Institut Pasteur ; nous n'y avons pas trouvé de toxine par examen direct. Mais l'ensemencement de petits fragments en bouillon VF glucosé anaérobie après chauffage de cinq minutes à 100° a permis d'obtenir une toxine de culture entièrement neutralisée par le sérum anti-C de l'Institut Pasteur.

La prophylaxie aussitôt organisée par anatoxine C a permis de juguler ce foyer.

Dans le but de discerner l'origine de ce foyer *a priori* inexplicable, nous avons fait rechercher dans le fourrage tout cadavre possible d'animal. Un cadavre de chat en pleine putréfaction y a été trouvé. La sérosité contenait à l'examen direct une toxine botulique neutralisée par le sérum anti-C ; par la méthode habituelle, nous avons isolé de cette sérosité la souche correspondante de *Cl. botulinum* C, dont la toxine tuait au 1/60 000 de centimètre cube.

Il est à noter que le chat mort a été trouvé dans un grenier contenant du fourrage qui n'était pas donné aux vaches. Mais ce grenier était au-dessus des vaches et par le plancher mal joint des poussières de fourrage tombaient sur les vaches qui les absorbaient. Le chat se trouvait exactement au-dessus de la vache morte la première, la deuxième vache morte (prélèvement du foie) était sa voisine de droite. La troisième vache morte trois semaines après (rachitique) était sa voisine de gauche.

C'est la cinquième souche de *Cl. botulinum* C que nous avons isolée en France de foyers de botulisme animal (équins et bovins) depuis 1949. Sur ces cinq souches, deux furent isolées directement du foie de chevaux morts avant tout traitement et trois de cadavres de chats trouvés dans le foin. C'est la diffusion dans le fourrage, soit d'une culture de *Cl. botulinum* C, soit de la toxine botulique C qui provoque le botulisme du bétail ingérant ce fourrage. Dans la première éventualité, le botulisme se présente comme une véritable toxi-infection alimentaire et on retrouve le microbe lui-même dans le foie (2 cas sur 5). Dans la deuxième éventualité, le botulisme se présente, de même que chez l'homme, comme une simple intoxication par toxine préformée. On retrouve la toxine dans le foie, mais non le germe. La fréquence de la pollution du fourrage par les cadavres de chats (trois fois sur cinq) incite à penser que cet animal est le vecteur habituel du botulisme C, fait qui est encore nié par quelques auteurs.

Nous avons voulu voir à quel sous-type toxinique appartenaient nos souches. Nous savions depuis le Congrès de Rome que la première souche isolée en France (# 468) appartenait au sous-type β de Seddon ; nous avons envoyé nos quatre souches au Dr J. B. Gunnison [San Francisco] (1) qui a bien voulu les examiner : toutes sont du type C β . Nous n'avons pas encore isolé de type C α en France et, sans pouvoir dire qu'il n'y existe pas, nous pouvons tout au moins supposer qu'il y est très rare.

(1) Nous remercions très vivement Miss J. B. Gunnison d'avoir bien voulu pratiquer la toxinotypie de nos souches.

CONCLUSIONS. — Le botulisme bovin du type C existe en France et son allure est aussi aiguë que le botulisme équin du même type. Comme pour ce dernier, le chat peut être l'animal vecteur. La sérothérapie anti-C et la prophylaxie par anatoxine C arrêtent l'évolution du foyer. La souche isolée est du sous-type C β comme toutes les souches C isolées jusqu'ici en France.

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLÉES DES SELLES DE PRÉMATURÉS ET DE NOURRISSONS

par G. MOUSTARDIER et B. DURAND.

(Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine de Bordeaux.)

Au cours d'une épidémie, survenue en juin 1953 au Centre des Pré-maturés de l'Hôpital des Enfants de Bordeaux (1), on a isolé, des selles d'enfants prématurés, de quelques nourrissons et d'une infirmière de ce centre, douze souches de *P. aeruginosa*.

Dans la relation que l'un de nous [1] a faite de cette épidémie, une étude bactériologique des souches isolées a été incorporée à l'étude clinique. C'est cette étude bactériologique que nous rapportons ici.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES. — L'examen microscopique des cultures de nos douze souches nous a montré des germes mobiles, non capsulés et présentant un assez grand polymorphisme.

Sur gélose ordinaire, en cultures jeunes, il s'agit de bâtonnets aux extrémités arrondies, parfois très courts et trapus, parfois fins et assez longs, mais le plus souvent filamenteux. Le nombre des formes longues et filamenteuses augmente dans les cultures âgées.

En bouillon ordinaire, on observe surtout des bâtonnets assez grêles et courts et ne présentant que très rarement des formes longues ou filamenteuses.

Tous ces germes se colorent facilement et ne prennent pas le Gram.

CARACTÈRES CULTURAUX. — Toutes les souches ont cultivé très rapidement en aérobiose sur les milieux usuels à 37°.

Sur gélose ordinaire, on observe, au bout de quinze à dix-huit heures, des colonies rondes, de 10 à 20 mm de diamètre, lisses et blanchâtres, avec un centre plus foncé et des bords sinueux et transparents. Nous n'avons pas observé de colonies de forme R, même sur les cultures âgées.

(1) Nous remercions le professeur Fontan, et son agrégé le professeur Verger, de nous avoir permis d'effectuer cette étude.

En bouillon ordinaire, on observe très rapidement, en neuf à dix heures, un trouble léger qui augmente rapidement et forme un dépôt abondant, sous la forme d'une mèche de pus.

A la surface du bouillon on note un voile blanc nacré ou légèrement grisâtre, plus ou moins fragmenté. Les cultures dégagent une odeur putride, extrêmement désagréable.

Sur pomme de terre, on observe, au bout de seize à dix-huit heures, une couche muqueuse, de couleur jaune grisâtre, qui envahit rapidement toute la surface de la pomme de terre et devient ensuite brunâtre.

Toutes les souches ont cultivé sur milieu au citrate.

PRODUCTION DE PIGMENTS. — Sur gélose, quelques heures après l'apparition des colonies, on observe une jolie fluorescence verte qui s'étend excentriquement autour des colonies, d'abord en surface, puis progressivement dans toute l'épaisseur de la gélose.

En bouillon, dès la douzième heure, il apparaît une coloration vert clair, qui, en vieillissant, devient progressivement vert foncé, puis brunâtre.

Sur pomme de terre, on observe rapidement une teinte verdâtre qui s'étend rapidement et envahit toute l'épaisseur de la pomme de terre. Deux souches n'ont pas donné de coloration verdâtre et ont conservé la couleur brunâtre du début.

Dans des cultures conservées à l'abri de la lumière, la pigmentation tourne, au bout de dix à quinze jours environ, au brun noirâtre, mais la surface de la culture conserve toujours son aspect muqueux.

Sur les douze souches étudiées, huit ont produit en même temps la pyocyanine et le pigment vert fluorescent, et quatre n'ont donné que le pigment fluorescent seul.

Nous n'avons jamais observé la production de pigments mélanogène (noir foncé) et érythrogène (jaune foncé, virant au rouge par oxydation).

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — *Métabolisme protéique.* — Toutes les souches ont liquéfié la gélatine et le sérum coagulé. L'attaque rapide du sérum coagulé, qui se traduit par une liquéfaction du milieu, en seize à dix-huit heures, peut servir comme élément de présomption dans le diagnostic après coproculture. Le lait est coagulé au bout de vingt-quatre heures avec digestion secondaire du caillot et apparition d'une coloration jaune verdâtre caractéristique.

Aucune des souches n'a donné de l'indole en eau peptonée, alors que toutes ont produit un léger dégagement d' H_2S .

Métabolisme glucidique. — Toutes les souches ont fermenté, sans dégagement de gaz en général, le glucose, le mannitol et le xylose, alors que le lactose, le maltose et le saccharose n'ont pas été attaqués.

Les réactions de Voges-Proskauer et du rouge de méthyle ont été négatives avec les douze souches étudiées.

Pouvoir réducteur. — Toutes les souches ont réduit les nitrates en nitrites, réduction mise en évidence par la réaction colorimétrique à la naphtylamine.

La réduction du bleu de méthylène a été très rapide par toutes les souches, alors qu'aucune d'entre elles n'a réduit le rouge neutre.

Pouvoir hémolytique. — Sur gélose au sang, toutes les souches ont provoqué une hémolyse très nette, qui s'est traduite par un halo de plusieurs millimètres de diamètre autour de chaque colonie isolée.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES. — Toutes ces souches ont présenté une très grande vitalité ; elles sont tuées par chauffage à 60° pendant trente minutes, mais résistent à la dessiccation et au vieillissement.

En raison du faible pouvoir pathogène habituel de ces germes, nous n'avons pas pratiqué d'étude expérimentale sur les animaux de laboratoire.

Etude sérologique. — Nous aurions voulu pratiquer une étude sérologique de nos douze souches de *P. aeruginosa*, mais nous n'avons pu le faire par suite du manque de sérums spécifiques qui, comme l'a montré Mayer Harting [2], sont très difficiles à préparer. M. le professeur Dumas, de l'Institut Pasteur de Paris, à qui nous avons demandé des sérums spécifiques, nous a fait savoir, qu'en raison de la multiplicité des groupes sérologiques et de la difficulté à obtenir de bons sérums spécifiques, il avait renoncé à leur préparation.

Cette étude aurait été intéressante, car elle aurait pu nous permettre de constater si, dans cette épidémie, toutes les souches isolées appartenaient aux mêmes groupes ou types sérologiques ou étaient sérologiquement différentes.

Etude lysotypique. — En vue d'une étude lysotypique nous avons envoyé au Dr Wahl, à l'Institut Pasteur de Paris, nos douze souches de *P. aeruginosa*. Cette étude, assez longue comme nous l'avait laissé prévoir le Dr Wahl, est encore en cours et nous ne pouvons dans cette note en donner les résultats.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques. — Nous avons recherché pour tous nos germes leur sensibilité aux antibiotiques fungiques et aux sulfamides. L'étude de l'action bactériostatique et bactéricide des antibiotiques fungiques et de leurs associations et celle de l'action bactériostatique des sulfamides a fait l'objet d'une note particulière, qui doit paraître prochainement [3].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

L'étude bactériologique de douze souches de *P. aeruginosa*, isolées des selles de prématurés et de nourrissons, a montré que toutes ces souches présentaient les caractères classiques de l'espèce type.

Seule l'étude sérologique aurait pu permettre une classification de nos souches en types sérologiques, identiques ou différents, ce qui aurait été très intéressant dans l'étude de cette épidémie.

L'étude lysotypique, encore en cours, permettra peut-être la différenciation de nos souches en plusieurs lysotypes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. DURAND. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1954.
- [2] A. MAYER HARTING. *J. gen. Microb.*, 1948, p. 31.
- [3] G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et B. DURAND. (A paraître dans *Revue Immunol. Thérap. antimicrob.*)

ÉTUDE DE 88 SOUCHES DE BACILLES TUBERCULEUX ISOLÉS DE 113 PRÉLÈVEMENTS DE LÉSIONS TUBERCULEUSES PLEUROPULMONAIRES

par J. BRUN, J. VIALIER et SUZANNE LAGER.

(*Institut Pasteur, Lyon.*)

La grande majorité de ces prélèvements provenaient de pièces d'exérèses pratiquées chez 30 sujets atteints de tuberculose pulmonaire. Les fragments ont été broyés au mortier avec de l'eau physiologique, le liquide et les fins débris recueillis à la pipette ont été centrifugés et le culot ainsi obtenu divisé en trois portions : pour examen direct après étalement et coloration par la méthode de Ziehl, pour cultures (deux milieux de Lœwenstein, un milieu de Dubos, un milieu de Dubos renfermant 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de dihydrostreptomycine), pour inoculation sous-cutanée au cobaye.

Pour une série homogène de 74 prélèvements, nous avons pu comparer les résultats fournis par les trois méthodes.

EXAMEN DIRECT POSITIF : 36 CAS.

Examen direct +; cultures +; inoculation +	30 cas
Examen direct +; cultures +; inoculation 0	3 cas
Examen direct +; cultures 0; inoculation +	4 cas
Examen direct +; cultures 0; inoculation 0	2 cas

EXAMEN DIRECT NÉGATIF : 38 CAS.

Examen direct 0; cultures +; inoculation +	17 cas
Examen direct 0; cultures +; inoculation 0	6 cas
Examen direct 0; cultures 0; inoculation +	2 cas
Examen direct 0; cultures 0; inoculation 0	13 cas

Pour 39 prélèvements nous n'avons pu faire une comparaison valable des trois méthodes (mort précoce du cobaye, contamination secondaire de la culture, examen tardif). Nous avons isolé au total quatre-vingt-huit souches et noté les particularités suivantes.

1° Le tableau précédent indique que, pour deux prélèvements renfermant des bacilles à l'examen direct, cultures et inoculations restèrent négatives. Les bacilles non viables [4, 2] provenaient du caseum d'une cavité pleine dans un cas, d'un infiltrat bronchogène dans l'autre. Ils voisinaient, en d'autres points de la même pièce d'exérèse, avec des bacilles viables et pathogènes pour l'animal qui présentèrent des caractères particuliers. Dans le premier cas, deux souches, insensibles à 1 ou 5 μg d'isoniazide, viables, ne tuberculisèrent pas le cobaye; trois autres souches viables, insensibles à 1 μg d'isoniazide, le tuberculisèrent. Dans le deuxième cas, deux autres prélèvements, bien que ne

renfermant pas de bacilles à l'examen direct, donnèrent naissance à des cultures et tuberculisèrent le cobaye ; une de ces deux souches était résistante à la streptomycine et au PAS mais sensible à l'isoniazide. Les deux sujets avaient reçu une quantité totale importante d'antibiotiques (100 g de streptomycine et isoniazide pour l'un ; 150 g de streptomycine, 45 g d'isoniazide, 3 180 g de PAS pour l'autre). Ainsi, à côté de bacilles non viables, il y avait sur la même pièce, au niveau d'autres lésions, des bacilles de vitalité et de virulence normales.

2° Pour 9 prélèvements, l'ensemencement donna naissance à des cultures de bacilles tuberculeux mais l'inoculation directe du même produit ne tuberculisa pas le cobaye. Trois fois des bacilles étaient visibles à l'examen direct, en plus ou moins grande abondance. Ces neuf souches correspondaient bien à *Mycobacterium tuberculosis*, mais leur virulence pour le cobaye était diminuée. Quatre provenaient de deux malades longuement traités par antibiotiques et pour lesquels aucun prélèvement de la pièce ne tuberculisa le cobaye. Deux de ces souches isolées, qui furent inoculées par voie sous-cutanée au cobaye à forte dose (2 mg/kg) le tuberculisèrent. A l'autopsie, quarante-cinq jours après l'inoculation, les lésions de tuberculose expérimentale étaient discrètes, la tuberculose restant localisée sans généralisation hépatique ou splénique. Les neuf souches injectées par voie intracutanée dans la peau rasée de l'abdomen du cobaye [3] se montrèrent virulentes. Toutes ces souches sauf une étaient sensibles à 5 μ g de streptomycine ; deux étaient résistantes à 1 ou 5 μ g d'isoniazide. L'activité uréasique, recherchée par le test d'Elek [4], était positive. L'activité catalasique, mesurée à plusieurs reprises sur des bacilles adultes selon la technique préconisée par Middlebrook, Cohn et Schaefer [5], fut plus ou moins marquée pour sept souches, resta négative pour les deux souches iso-résistantes.

Les sensibilités des neuf souches à l'isoniazide fut recherchée de dix à six mois après l'isolement, avec un ou deux repiquages intermédiaires. Les sensibilités retrouvées furent superposables et les deux souches résistantes l'étaient encore à 1 μ g, mais la sensibilité de l'une d'elle avait augmenté [6] et l'activité catalasique, bien que faible, était incontestable.

3° Par comparaison avec ces souches dont la virulence était fortement diminuée, douze autres obtenues par ensemencement de divers prélèvements chez 6 malades, étaient fortement résistantes à l'isoniazide (+ 20 μ g) ; deux l'étaient à 10. Ces 14 prélèvements tuberculisèrent le cobaye dans des délais normaux. Six fois les bacilles, certainement rares, n'avaient pas été mis en évidence par l'examen direct.

Pour ces 14 prélèvements la souche secondairement isolée à partir du ganglion inguinal du cobaye tuberculisé avait en général une plus grande sensibilité à l'isoniazide. Un premier groupe de 4 prélèvements chez un même sujet avait donné par cultures directes quatre souches insensibles à 20 μ g d'isoniazide. Le cobaye tuberculisé permit d'isoler trois souches insensibles à 20 μ g, une quatrième sensible à 10 (+ 5-10). Les huit autres souches résistantes à 20 μ g correspondirent à une souche résistante à 20, deux sensibles à 0,05, deux à 0,1, une à 1, deux à 10 μ g.

En somme, quatre fois, la souche isolée par culture directe était forte-

ment iso-résistante, celle isolée après passage par l'organisme du cobaye était sensible. A l'opposé, pour d'autres prélèvements, six fois la souche cobaye se montra moins sensible à l'isoniazide que la souche culture, mais deux fois seulement la divergence fut suffisamment importante (+ 0,1-+ 10) pour que la première soit sensible et la seconde résistante. Ces discordances entre la sensibilité de la souche par culture directe et celle de la souche isolée par l'animal ont été obtenues avec un pourcentage équivalent pour des fragments renfermant ou non des bacilles à l'examen direct. Elles peuvent s'expliquer, dans les conditions où nous nous sommes placés, par un phénomène de Welsch [7]. Au départ, le produit injecté correspondait à un mélange de germes de sensibilité à l'isoniazide et d'activité pathogène divergentes. Ces 14 prélèvements à bacilles nettement iso-résistants se sont révélés fortement pathogènes pour le cobaye [8, 9, 10, 11].

4° En ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques des bacilles isolés par cultures directes, nous avons mis en évidence les faits suivants déjà classiques [12] : chez 24 malades, la sensibilité aux trois antibiotiques, isoniazide, streptomycine, PAS, de souches isolées de prélèvements différents au niveau des mêmes pièces anatomiques, se montra concordante avec seulement 4 discordances, trois fois pour un seul antibiotique, une fois pour deux, un prélèvement se montrant sensible alors que les autres étaient résistants.

Nous avons cherché à établir le degré de résistance acquise du bacille tuberculeux en fonction de la dose totale d'antibiotiques reçue depuis le début de la maladie. Nous n'avons tenu compte que des prélèvements pour lesquels aucun doute n'était possible sur la quantité d'antibiotiques administrée. Nous avons retenu pour la streptomycine un groupe de 21 malades (61 souches). Les chiffres indiquent le nombre de malades et le nombre de souches isolées et testées (entre parenthèses) [tableau I].

TABLEAU I. — Streptomycine.

Quantité en grammes	0	50	100	150	200
Sensibilité en μg					
20	4 (12)	5 (20)	5 (16)	2 (2)	1 (1)
50		1 (1)			
100				(1)	
		1 (3)		1 (3)	1 (2)

En ce qui concerne l'isoniazide, nous avons obtenu le tableau suivant (tableau II) pour 19 malades et 52 souches isolées.

Ces deux tableaux montrent la persistance d'un nombre assez important de bacilles sensibles à l'antibiotique malgré une dose totale administrée élevée. Il s'agissait, dans la très grande majorité des cas sinon dans tous, de traitements associés. Les bacilles résistants aux antibiotiques trouvés dans les lésions anatomiques sont relativement rares, mais ils sont souvent insensibles à plusieurs antibiotiques.

TABLEAU II. — Isoniazide

Quantité en grammes	0	1	5	10	20	30	40	100
Sensibilité en μg 0,5	3 (14)	1 (2)	1 (2)	2 (4)	1 (2)		4 (6)	2 (4)
1								
10			1 (5)					
				1 (5)	2 (3)	1 (4)		(1)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. TISON. *Ces Annales*, 1954, **87**, 99.
 [2] E. M. MEDLAR, S. BERNSTEIN et D. M. STEWARD. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **66**, 1.
 [3] J. H. KITE, R. A. PATNODE et J. I. READ. *Amer. J. clin. Path.*, 1952, **22**, 250.
 [4] A. TACQUET, CH. GERNEZ-RIEUX et B. GAUDIER. *Ces Annales*, 1954, **87**, 335.
 [5] G. MIDDLEBROOK, M. L. COHN et W. B. SCHAEFER. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1954, **70**, 852.
 [6] M. BARNETT, S. R. M. BUSHBY et D. A. MITCHISON. *Lancet*, 1953, **67**, 314.
 [7] J. VIALIER et R.-M. CAYRÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **158**, 688.
 [8] A. G. KARLSON et Y. IKEMI. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1954, **29**, 119.
 [9] G. MEISSNER. *Beitr. klin. Tuberk.*, 1954, **110**, 538.
 [10] L. R. HEIZER, D. WIDELock et S. KLEIN. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1953, **68**, 290.
 [11] G. MIDDLEBROOK et M. L. COHN. *Science*, 1953, **118**, 297.
 [12] CH. GERNEZ-RIEUX, P. RAZEMON, P. FOURNIER et C. VOISIN. *Le Poumon*, 1954, n° 6.

SUR LA SENSIBILITÉ *IN VITRO* DE *TRICHOMONAS GALLINAE* ET DE *TRICHOMONAS FETUS* A LA NÉOMYCINE ET A LA VIOMYCINE

par J. DEOM et J. MORTELMANS.

(Laboratoire Vétérinaire, Elisabethville, Congo Belge.)

La Néomycine, découverte par Waksman et Lechevalier [1] à partir de *Streptomyces fradiae*, et la Viomycine, découverte par Finlay et ses collaborateurs [2] à partir de *Streptomyces puniceus* ainsi que par Bartz et ses collaborateurs [3] à partir de *Streptomyces floridiae*, possèdent peu ou pas d'activité sur les protozoaires.

Des expériences ont déjà été entreprises pour rechercher l'action inhibitrice de la Néomycine sur *Trichomonas vaginalis* [4, 5].

Nous avons voulu étudier l'action de ces deux antibiotiques sur deux espèces de Trichomonades qui jouent un rôle important en médecine vétérinaire, *Trichomonas gallinae* et *Trichomonas fetus*.

Au cours de ces essais, nous avons employé le milieu de Schneider modifié tel que nous l'avons déjà décrit ailleurs [6]. Nous l'avons préparé et réparti pour ces essais de façon telle que la fraction solide de chaque tube contienne 7 ml de milieu et la fraction liquide 8 ml. Les antibiotiques furent ajoutés à la fraction liquide dans les proportions suivantes :

TUBE N°	MICROGRAMMES par ml
1.	270
2.	200
3.	130
4.	60
5.	50
6.	25
7.	10
8.	0

Nous avons éprouvé une souche de chaque espèce. Chacun des 8 tubes de chaque série étaitensemencé à la pipette Pasteur avec V gouttes de la fraction liquide d'une culture de trois jours riche en protozoaires vivants.

Après deux jours d'incubation à 37° C, nous avons observé, pour les deux espèces de Trichomonades et les deux antibiotiques, une croissance abondante dans tous les tubes. Nous n'avons remarqué aucune différence entre les tubes de contrôle et ceux additionnés d'antibiotique.

CONCLUSION. — Avec la méthode utilisée, nous n'avons pu mettre en évidence une action inhibitrice quelconque de la Néomycine ou de la Viomycine sur *Trichomonas gallinae* et *Trichomonas fetus*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. A. WAKSMAN et H. A. LECHEVALIER. *Science*, 1949, **109**, 305.
- [2] A. C. FINLAY, G. L. HOBBY, F. HOCHSTEIN, T. M. LEES, T. F. LENERT, J. A. MEANS, S. Y. P'AN, P. P. REGNA, J. B. ROUTIEN, B. A. SOBIN, K. B. TATE et J. H. KANE. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1951, **63**, 1.
- [3] Q. R. BARTZ, J. EHRLICH, J. D. MOLD, M. A. PENNER et R. M. SMITH. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1951, **63**, 4.
- [4] O. FELSENFELD, I. F. VOLINI, S. J. ISHIHARA, M. C. BACHMAN et V. M. YOUNG. *J. Lab. clin. Med.*, 1950, **35**, 428.
- [5] S. A. WAKSMAN, E. KATZ et H. LECHEVALIER. *J. Lab. clin. Med.*, 1950, **36**, 93.
- [6] J. DEOM et J. MORTELMANS. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 942.

OXYDATION DU LACTOSE EN ACIDE LACTOBIONIQUE PAR DES BACTÉRIES PATHOGÈNES OU SAPROPHYTES (*B. ANITRATUM*)

par PIERRE VILLECOURT et HENRI BLACHÈRE.

(*Institut Pasteur, Service des Fermentations
et Institut National de la Recherche Agronomique.*)

Les cultures de *Bacterium anitratum* en eau peptonée, fortement concentrée en lactose et très aérée, s'accompagnent d'une acidification [1, 2]. L'action si caractéristique de cette bactérie sur le glucose oxydé quantitativement en acide gluconique [3] invitait à examiner en détail la transformation du lactose.

Nous avons d'abord recherché un milieu de culture dans lequel le lactose était rapidement attaqué. Nous avons ensuite étudié le phénomène dans l'appareil de Warburg par la technique des bactéries non proliférantes. Nous avons ensuite isolé et caractérisé le produit de transformation du lactose.

TECHNIQUES. — Nous avons utilisé parallèlement deux souches de *Bacterium anitratum*, une saprophyte N. W. 69 isolée du sol et une pathogène, la souche péricardite, fournie par le Dr Piéchaud. Les cultures étaient faites sur un milieu minéral renfermant du nitrate, 2 p. 100 d'alcool, 10 p. 100 de lactose, et 2 p. 100 de CO_3Ca ; les fioles de cultures étaient agitées et la croissance massive. L'appareil de Warburg était réglé à 37° et on y utilisait des bactéries lavées une fois, mises en suspension dans un tampon phosphate de pH 6,3. Le lactose était dosé par son pouvoir réducteur selon Somogyi.

RÉSULTATS. — Les deux souches ont eu le même comportement dans toutes les manipulations.

1° Lorsque le milieu de culture est privé d'alcool et contient le lactose comme seul aliment carboné la croissance est nulle ;

2° L'évolution de la teneur en lactose a été suivie au cours de la culture sur milieu contenant alcool et lactose.

Expérience 1 : au temps 0, le milieu de culture étaitensemencé abondamment avec la souche N W 69.

AGE DE LA CULTURE en heures	LACTOSE EN MG/ML du milieu de culture
—	—
0.	100
24.	40
43.	20
65.	9,5

La plus grande partie du lactose a disparu au bout de vingt-quatre heures de culture ; la vitesse de cette disparition se ralentit fortement lorsque la concentration en lactose diminue.

3° Les manipulations suivantes ont été faites dans l'appareil de Warburg. Nous avons d'abord préparé les bactéries en partant d'une culture sur milieu complet contenant alcool et lactose.

a) L'absorption d'oxygène par les bactéries en présence de diverses concentrations de lactose a été mesurée.

Expérience 2 :

Concentration du lactose					
dans les cupules . . .					
	0	1 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100
QO ₂ {	N. W. 69	20	40	160	200
	Péricardite	40	65	280	260

Les bactéries fixent de l'oxygène en présence de lactose et l'intensité de cette fixation dépend de la concentration du lactose ; ce résultat rejoint l'évolution de la vitesse de disparition du lactose dans les cultures et justifie la nécessité de l'eau peptonée à forte concentration en lactose utilisée pour caractériser l'acidification du lactose par *Bacterium anitratum* [4].

b) Après un temps de réaction on a combiné la mesure de l'oxygène absorbé au dosage du lactose disparu.

Expérience 3 : Chaque cupule contient 3,2 mg de bactéries de la souche « péricardite ».

Concentration du lactose dans les cupules . . .	0	5 p. 100
Oxygène absorbé en 2 heures	64 μ l	428 μ l
Lactose disparu		12,2 mg

En déduisant la respiration endogène, 364 μ l d'oxygène soit 32,5 μ atomes grammes oxydant 12,2 mg de lactose soit 33,9 μ mole.

Un atome d'oxygène est donc absorbé pendant l'attaque d'une mole de lactose.

c) L'absorption en présence et en absence de potasse dans la cupule centrale a été comparée.

Expérience 4 : Chaque cupule reçoit 2 mg de bactéries de la souche N W 69.

Concentration du lactose dans la cupule . . .	0	10 p. 100	10 p. 100
Potasse dans la cupule centrale	+	+	—
Absorption en 15 minutes	2 μ l	68,5 μ l	69,5 μ l

L'absorption reste identique et l'oxydation du lactose ne s'accompagne donc pas de la production de gaz carbonique.

Nous avons aussi préparé les bactéries à partir d'une culture sur milieu contenant de l'alcool, mais privé de lactose, et mesuré l'oxygène absorbé par ces bactéries au contact du lactose.

Expérience 5 : Chaque cupule reçoit 0,8 mg de bactéries.

Concentration du lactose dans la cupule . . .	0	10 p. 100	0
Concentration du glucose dans la cupule . . .	0	0	1 p. 100
Oxygène absorbé en 10 minutes	4 μ l	6 μ l	45 μ l

Les bactéries cultivées en l'absence de lactose, sont pratiquement incapables d'attaquer le lactose ; l'enzyme qui oxyde le lactose, contrairement à l'enzyme qui oxyde le glucose, n'est pas constitutif.

L'oxydation du lactose demandant 1 atome d'oxygène par mole de lactose et ne produisant pas de gaz carbonique, la formation d'acide lactobionique devenait probable. Utilisant la souche N. W. 69 nous avons préparé et caractérisé le produit d'oxydation du lactose : 1 800 ml de milieu contenant 180 g de lactose sont ensemencés avec N. W. 69 et la culture est arrêtée au bout de soixante-cinq heures ; il reste encore à ce moment dans le milieu 26,5 g de lactose inattaqué. Le milieu est centrifugé, une partie du surnageant est additionnée de chaux pour former le sel de calcium [4] que l'on précipite avec 2 volumes d'alcool. Le précipité est redissous dans l'eau, traité par CO_2 jusqu'à neutralisation et on sépare CO_3Ca par centrifugation, avec 6 volumes d'alcool, on précipite dans le surnageant 72 g de produit brut ; après l'avoir redissous dans l'eau et reprécipité avec 1,5 volume d'alcool, on a obtenu un produit purifié dont les propriétés correspondent à celles du lactobionate de calcium.

	VALEUR TROUVÉE	VALEUR THÉORIQUE
Teneur en calcium	5,4	5,3
Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D \text{ H}_2\text{O}$.	+ 23°,4	+ 23°,8 (5)

Le produit brut à la concentration de 5 p. 100 a été hydrolysé avec CHN pendant quatre heures dans un bain-marie bouillant ; le dosage selon Somogyi du pouvoir réducteur apparu dans l'hydrolysate correspondait à 95 p. 100 du galactose, calculé pour une hydrolyse totale d'acide lactobionique. Les constituants de l'hydrolysate ont été caractérisés par deux méthodes [4] après neutralisation de l'hydrolysate par la chaux et précipitation à l'alcool ; le galactose a été caractérisé à partir du surnageant alcoolique par la formation d'acide mucique et l'acide gluconique à partir du précipité par son phénylhydrazide-2, l'hydrolysate, débarrassé de ses cations par une résine amberlite 1 R 105, a été chromatographié sur papier Whatman n° 1 ; un développement par le phénol saturé d'eau et une révélation au phtalate acide d'aniline montrent une seule tache correspondant à celle du galactose utilisé comme témoin et à un R F de 0,5 : un développement par le mélange butanol-propionique et une révélation au bleu de bromophénol montrent une seule tache correspondant à celle de l'acide gluconique utilisé comme témoin et à un R F de 0,3 ; avec un hydrolysate partiellement décomposé on obtient une deuxième tache correspondant à l'acide lactobionique et à un R F de 0,15.

DISCUSSION. — En 1947 Stodola et Lockwood ont décrit pour la première fois la production biochimique d'acides bioniques ; une souche de *Pseudomonas* oxydait le lactose en acide lactobionique avec un rendement de 75 p. 100 ; à notre connaissance cette propriété n'a jamais été signalée hors du genre *Pseudomonas*. En comparant *Bacterium anitratum* aux *Pseudomonas* nous ferons deux remarques : d'une part, le lactose n'est pas utilisable pour la croissance de *Bacterium anitratum*, alors que les *Pseudomonas* semblent capables d'utiliser cet acide [5, 6] ; d'autre part le lactose n'est pas attaqué par toutes les

souches de *Pseudomonas* [5, 6]. Au contraire, nous avons déjà souligné la grande homogénéité de *Bacterium anitratum* ; les 15 souches saprophytes et les 6 souches pathogènes que nous avons examinées, cultivées en eau peptonée (0,5 p. 100) contenant 4 p. 100 de lactose acidifient le milieu [7].

RÉSUMÉ. — *Bacterium anitratum* est incapable sur un milieu minéral d'utiliser le lactose comme aliment carboné pour sa croissance, mais il l'oxyde cependant en acide lactobionique sans dégradation ultérieure. Cette réaction est due à un enzyme adaptatif et sa vitesse dépend fortement de la concentration du lactose au contact des bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. G. SCHAUH et F. D. HAUBER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 379.
- [2] H. BLACHÈRE, P. VILLECOURT et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1952, **83**, 391.
- [3] M. LEMOIGNE et M. CROSON. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1075.
- [4] H. S. ISBELL. *U. S. patent 1.980. 996*, 20 novembre 1934.
- [5] F. H. STODOLA et L. B. LOCKWOOD. *J. biol. Chem.*, 1947, **174**, 213.
- [6] A. J. KLUYVER, J. DE LEY et A. RIJVEN. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1951, **17**, 1.
- [7] P. VILLECOURT et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1954, **86**, 493.

TOXOPLASMOSE DU CHIEN EN FRANCE

par M. LOZACH et C. VIALAT.

(Institut Pasteur. Service de la Rage.)

La toxoplasmose a été découverte par C. Nicolle et L. Manceaux en 1909 chez le gondi [1]. Elle a été décrite depuis chez de nombreuses espèces animales : lapin, cobaye, souris, rat, écureuil, taupe, serpent, lézard, cynocéphale, chimpanzé, pigeon domestique, moineau et canari.

Chez le chien, elle a été décrite pour la première fois par Mello en Italie (1910) [2], puis au Brésil par Carini (1911) [3] qui, avec Maciel, réussit à transmettre la maladie au chien et au pigeon.

Laveran, Marullaz en France (1913) [4] infectent le chien par voie veineuse avec *Toxoplasma gondii*.

Le premier cas de toxoplasmose spontanée du chien fut rapporté en France par Boez (1921) [5] qui n'a pu transmettre la maladie au chien. Nicolau et Kopciowska signalent en 1935 [6] un cas de toxoplasmose spontanée du chien et transmettent la maladie au cobaye et au lapin.

A l'occasion des examens systématiques des névraxes d'animaux mordeurs dans le service de la rage, il a été constaté à plusieurs reprises des images d'infection toxoplasmique du chien (têtes venant des départements de Seine-et-Oise, Oise, Lozère et Moselle).

A titre de confirmation expérimentale, le germe a été isolé du cerveau du chien n° 640.

Ce chien était un croisé griffon de 2 ans, qui avait présenté, à partir de fin novembre, des signes digestifs d'abord, et quelques jours plus tard des signes nerveux avec hallucinations, tendance agressive, à l'occasion desquels il mordit deux personnes, d'où son envoi dans le service.

A l'examen du névraxe, on constatait, au niveau du ganglion de Gasser, une infiltration importante du tissu de soutien, sans aucune altération des cellules nobles. Le cerveau présentait des lésions de méningite localisées au niveau des septums, mais aucune lésion de périvascularite, ni d'infiltration en foyers du parenchyme. Un plus fort grossissement faisait apparaître au niveau de la commissure interhémisphérique et d'une zone d'infiltration très localisée, de nombreuses formations enkystées, dont la morphologie rappelait celle du toxoplasme. Ces formations se colorent en bleu par la méthode de Mann.

On retrouvait ces parasites, soit libres, soit enkystés, sans aucune infiltration périphérique, au niveau de la corne d'Ammon et des noyaux centraux. Aucune lésion histologique ne permettait d'attribuer la maladie clinique à une encéphalite de Carré ou à une encéphalite canine type Rubarth.

L'inoculation a été faite par voie intrapéritonéale à la souris, à partir d'une émulsion d'un fragment de cerveau conservé en glycérine depuis dix jours.

Dès le premier passage, on constatait l'hypertrophie spléno-hépatique, avec présence de sérosité péritonéale où les toxoplasmes sont peu abondants et se présentent sous forme de parasites libres en voie de division.

Les passages furent progressivement rapprochés, et dès le cinquième la réaction péritonéale devient plus importante, et la sérosité contient de grands mononucléaires renfermant des toxoplasmes, dès le troisième jour suivant l'inoculation. A côté de ces grands mononucléaires, on trouve des lymphocytes et quelques polynucléaires.

On retrouve non seulement les formes typiques, décrites par Nicolle, formes en croissant dont une extrémité est plus effilée que l'autre, mais encore des formes en voie de division binaire ou même en tétrade.

On note également des formations nettement sphériques avec une ligne équatoriale plus claire tout à fait analogues aux formes qui ont été observées sur les cultures de tissus par Chernin et Weller [7].

Les coupes histologiques de foie et de rate montrent des images de toxoplasmes enkystés et libres, ces dernières formes étant évidemment plus irrégulières et n'étant jamais incluses dans les cellules du tissu parasité.

La toxoplasmose canine est une affection qui sévit en France dans plusieurs départements et peut être à l'origine d'une encéphalite canine pouvant cliniquement évoquer la suspicion de rage.

Le problème se pose, en outre, du mode de contamination éventuelle de l'homme et des animaux, problème auquel, jusqu'alors, aucune réponse n'a été donnée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. NICOLLE et L. MANEAUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1909, **148**, 369.
- [2] U. MELLO. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1910, **3**, 359.
- [3] A. CARINI. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1911, **4**, 518.

- [4] A. LAVERAN, M. MARULLAZ et MESNIL. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1913, **6**, 460.
[5] L. BOËZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 479.
[6] S. NICOLAU et L. KOPCIOWSKA. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1935, **28**, 490.
[7] E. CHERNIN et T. WELLER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 68.

**SUR L'EXISTENCE PROBABLE
DE NOUVEAUX ANTIGÈNES DES *BRUCELLA*,
AVEC UN NOUVEAU SCHÉMA PROPOSÉ
POUR REPRÉSENTER
LA RÉPARTITION DE ANTIGÈNES**

par G. RENOUX et L. W. MAHAFFEY.

(Institut Pasteur de Tunis.)

L'existence de plusieurs antigènes des *Brucella* est connue depuis que Feusier et Meyer [4] ont décrit quatre types sérologiques distincts. L'étude de ces antigènes et des sérums leur correspondant a suscité une abondante littérature jusqu'aux publications de Wilson et Miles [2] qui, tenant le plus grand compte de l'état « lisse » ou « rugueux » des souches, établissent un schéma devenu classique qui objective par juxtaposition linéaire la présence dans toutes les souches « lisses » de *Brucella* de deux antigènes, A et M, en proportions variables selon qu'on a affaire à *Br. melitensis*, *Br. abortus* ou *Br. suis*. Ces conclusions ont trouvé une justification éclatante en permettant de préparer aisément, si l'on veut bien suivre les principes établis par ces auteurs, des sérums monospécifiques absorbés anti-*abortus* ou anti-*melitensis*.

Cependant, cette représentation ne rend pas compte très clairement des faits suivants :

Comment l'absorption par *Br. melitensis* d'un sérum préparé par injection à l'animal d'une suspension de *Br. abortus* laisse-t-elle intacte la portion *abortus* de l'anticorps, puisque *Br. melitensis* contient côte à côte les deux antigènes ?

Pourquoi, et pour les mêmes raisons de coexistence d'antigènes, une souche de *Br. melitensis*, par exemple, n'est-elle pas agglutinée par un sérum anti-*abortus* absorbé ?

Pourquoi les souches de *Br. suis* sont-elles, en règle générale, électivement agglutinées seulement par le sérum anti-*abortus*, alors qu'elles contiennent en quantités à peu près égales — et côte à côte — les deux antigènes et devraient donc être indifféremment agglutinées par les deux sérums monospécifiques ? En effet, presque toutes les souches de *Br. suis* sont agglutinées uniquement par le sérum anti-*abortus*. Il existe de très rares exceptions ; dans ces cas, la souche de *Br. suis* n'est agglutinée que par le sérum anti-*melitensis*.

Quoi qu'il en soit, la possibilité de préparer des sérums monospécifiques anti-*abortus* et anti-*melitensis* et d'utiliser ces sérums pour une

différenciation pratique des souches de *Brucella* rend les plus grands services et nous n'aurions pas songé à modifier l'hypothèse qui permet ces préparations si des constatations nouvelles ne nous y avaient conduits.

Buddle [3] a décrit une nouvelle « variété » de *Brucella* responsable d'une maladie de l'appareil génital des ovins de Nouvelle-Zélande. Cet auteur a eu l'amabilité d'envoyer au Service de la Brucellose de l'Institut Pasteur de Tunis quelques-unes de ces souches dont nous rappelons brièvement les caractères : bacilles à Gram négatif, immobiles, n'attaquant aucun sucre dans les conditions usuelles du laboratoire ; n'hydrolysant pas l'urée ; demandant nécessairement une atmosphère de CO_2 pour se développer ; non agglutinés par un sérum anti-*Brucella*, agglutinés par les sérums spécifiques, spontanément agglutinables bien que les colonies aient, à la loupe binoculaire, l'apparence de colonies lisses de *Br. melitensis* ; ayant les caractères de *Br. melitensis* (parfois *Br. suis*) sur les milieux additionnés de colorants — thionine ou fuchsine basique — ou en présence de diéthylthiocarbamate de soude [4] ; pathogènes, causent des lésions de l'appareil génital.

Au cours des études que nous avons faites de ces souches, nous avons été conduits à multiplier les examens sérologiques.

Pour obvier à l'inconvénient de l'agglutination spontanée (un caractère des *Brucella* « R ») nous avons constaté qu'il suffisait, le plus souvent, d'ajouter 10 p. 100 de sérum de lapin normal à la suspension microbienne : ainsi traitée elle devient stable comme une suspension « S ». Cependant on peut isoler d'une culture des colonies — comme nous l'avons vu avec la souche O.10 par exemple — dont la descendance sera instable malgré cette adjonction de sérum de lapin normal. La présence de sérum de lapin normal dans la suspension microbienne n'en modifie pas les caractères antigéniques. Toutes les cultures nécessaires sont faites, selon le besoin, en atmosphère contenant 10 p. 100 d'acide carbonique, sur gélose « Albimi ». Les lapins, fournisseurs de sérums, sont préparés par une injection unique de 5 milliards de bacilles vivants suspendus en eau salée à 0,85 p. 100 et tamponnée à pH 6,9 ; ils sont saignés entre sept et neuf jours après cette injection.

Les absorptions d'agglutinines sont faites en mettant en présence des quantités fixes de sérum et des quantités croissantes de purée microbienne ; après trois heures à l'étuve à 37° C les mélanges sont centrifugés, le sérum surnageant est prélevé et sert à pratiquer, avec le bacille homologue, des réactions d'agglutination qui sont lues après quarante-huit heures d'incubation à 37° C. Le sérum où l'absorption est complète sera alors utilisé pour la recherche d'agglutinines actives sur d'autres variétés de *Brucella*.

Une partie des expériences est résumée dans le tableau ci-joint.

Souches : 53 O.10 isolée en Nouvelle-Zélande par Buddle sous le n° 727.

53 H.38 isolée au Mexique (*Br. melitensis*) par Castaneda sous le n° 6148.

H.105 « R », descendance d'une colonie « rugueuse » de la souche H.105 isolée en France au C. R. F. O.

C.16 A, variant « rugueux » isolé du sang d'une brebis infectée par la souche 53 H.38.

54 B.101, isolée au Japon (*Br. abortus*) en 1927 sous le n° 125 (Institut des Maladies infectieuses, Tokyo).

Résultats des réactions d'agglutination.

(Taux maximum recherché à 1/320).

SÉRUMS-ANTI	SOUCHES				
	53 O.10	H.105 "R"	C.16 A	53 H.38	54 B.101
O.10	320	40	160	—	—
O.10 absorbé par H.105 "R"	320	—	—	—	—
O.10 absorbé par C.16 A	160	—	—	—	—
O.10 absorbé par H.38	320	—	—	—	—
O.10 absorbé par <i>abortus</i> "S".	80	—	—	—	—
O.10 absorbé par O.10	—	—	—	—	—
H.105 "R".	80	320	320	—	—
H.105 "R" absorbé par O.10	—	—	—	—	—
H.105 "R" absorbé par C.16 A.	40	—	—	—	—
C.16 A.	160	320	320	—	—
C.16 A absorbé par O.10	—	—	—	—	—
C.16 A absorbé par H.105 "R".	80	—	—	—	—
<i>Melitensis</i> non absorbé (Tunis).	—	—	—	320	320
<i>Abortus</i> non absorbé (Weybridge).	40	—	—	320	320
<i>Melitensis</i> absorbé (Tunis)	—	—	—	320	—
<i>Abortus</i> absorbé (Tunis)	40	—	—	—	320

Il ressort de ce tableau que :

Les souches de *Br. melitensis* en phase R contiennent un antigène « r » des colonies « rugueuses » ; l'antisérum correspondant agglutine *spécifiquement* sur lame ou en tube de telles colonies R, étant bien entendu que l'antigène utilisé pour les réactions en tube doit être stabilisé par l'adjonction de 10 p. 100 de sérum de lapin normal ;

Ce même antigène « r » existe dans les souches ovines de Nouvelle-Zélande ; nous avons vérifié sa présence dans les sept souches que nous a envoyées Buddle (1) ; il est également présent dans les souches ovines d'Australie isolées par Simmons et coll. [5] qui ont bien voulu nous confier deux de leurs souches ;

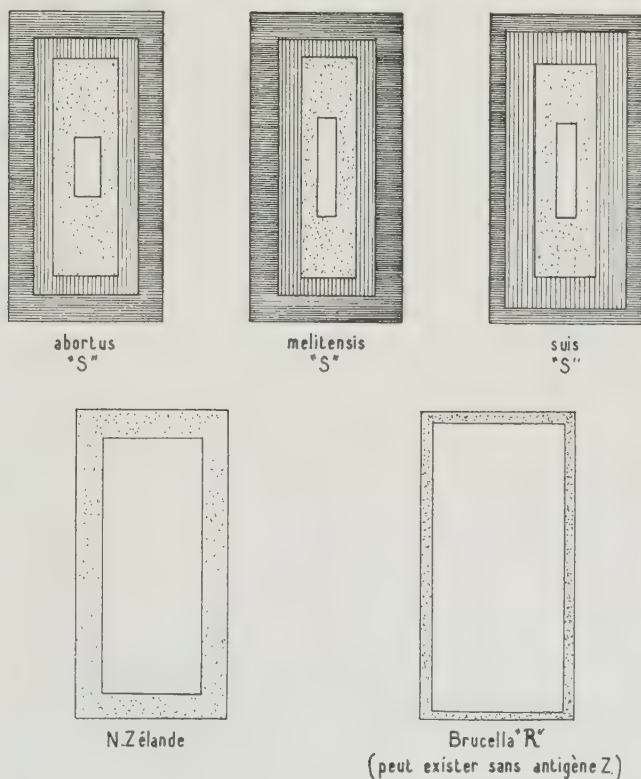
Les réactions d'agglutination croisée permettent de postuler l'existence d'un antigène nouveau dans ces souches ovines : antigène « Z ». Cet antigène existerait aussi, mais en plus faible quantité, dans certaines souches R de *Br. melitensis*. Il existerait également dans les souches « S » de *Br. abortus*.

(1) Buddle nous a récemment fait part de résultats d'agglutinations croisées qu'il a obtenus avec les souches isolées en Nouvelle-Zélande ; les faibles taux d'agglutination de ces souches ovines par le sérum anti-*abortus* s'expliqueraient par la présence dans ce sérum d'une petite quantité d'anticorps « r » amené par l'existence d'éléments « rugueux » dans la souche de *Br. abortus* qui a servi à préparer les lapins.





D'autres recherches en cours laisseraient soupçonner que ces antigènes « Z » et « r » ne seraient pas uniques.

Ces résultats confirmeraient que les souches ovines particulières récemment isolées en Nouvelle-Zélande ou en Australie seraient bien

SCHEMA DE LA REPARTITION DES ANTIGENES DES BRUCELLA



LEGENDE

	antigène A		antigène Z
	antigène M		antigène r

des *Brucella* ; ils nous amènent, pour pouvoir expliquer clairement les résultats sérologiques obtenus, à concevoir un nouveau schéma de la répartition des antigènes des *Brucella*, qu'il faut placer concentriquement plutôt qu'en ligne comme il est classique de l'admettre, sans oublier qu'il est toujours nécessaire de tenir compte des « quantités » respectives des antigènes (cas de *Br. intermedia* par exemple).

Une telle représentation expliquerait que, dans l'organisme, une souche de *Brucella* puisse donner naissance à plusieurs anticorps anti-*Brucella*, puisqu'on admet que les corps microbiens se dissocient *in vivo*. Au contraire, dans nos tubes à réaction, les bacilles sont intacts, l'union antigène-anticorps ne se fait qu'à la surface des corps microbiens et les sérums spécifiques ne réagiront qu'avec un seul antigène, le plus superficiel.

La plasticité extraordinaire des *Brucella*, que connaissent bien ceux qui étudient ces bacilles, rend très difficile les recherches sérologiques : on sait à quel point il est malaisé de conserver une souche en phase pure. Ce schéma n'est donc pas définitif ; l'écueil à éviter sera, cependant, la multiplication intensive des antigènes nouveaux. Il semble bien qu'à côté des variétés connues (*melitensis*, *abortus*, *suis*, *intermedia*, « néo-zélandaise ») on puisse trouver à peu près toutes les combinaisons antigéniques possibles et — peut-être — autant d'antigènes que de formes de colonies qu'on pourra sélectionner.

RÉSUMÉ.

1° Les souches ovines isolées en Nouvelle-Zélande par Buddle appartiennent bien à l'espèce *Brucella* dont elles ont les caractères biochimiques ; elle possèdent un antigène spécifique (antigène « Z ») qui se retrouve en plus faible quantité dans *B. abortus* en phase « rugueuse », parfois dans *Br. melitensis* « R ».

2° Il existe chez *Brucella* en phase « rugueuse » au moins un antigène « r ».

3° On peut, par une représentation graphique concentrique des antigènes des *Brucella* dans le corps microbien, rendre compte du comportement sérologique des diverses variétés de *Brucella*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. L. FEUSIER et K. F. MEYER. *J. inf. Dis.*, 1920, **27**, 185.
- [2] C. S. WILSON et A. A. MILES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 1.
- [3] M. B. BUDDLE et B. W. BOYES. *Austral. Veter. J.*, 1953, **29**, 145.
- [4] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1952, **82**, 556.
- [5] G. C. SIMMONS et W. T. K. HALL. *Austral. Veter. J.*, 1953, **29**, 33.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Action des substances colorantes sur les mycobactéries.
IV. Colorants acides. Influence du pH, par J. DESBORDES,
 E. FOURNIER et D. ALIX.

Effets exercés par la patuline et des mélanges patuline-cystéine sur les propriétés physiologiques des cellules phagocytaires, par A. DELAUNAY, Ph. DANIEL, C. DE ROQUEFEUIL et M. HENON.

Evolution vers la résistance aux antibiotiques des germes isolés à Paris chez les malades de ville de 1949 à 1954,
par G. TERRIAL et Y. CHABBERT.

AVIS

Première Rencontre Européenne de Standardisation biologique. — A la suite d'une réunion tenue à Berne le 15 novembre 1954, l'Association Internationale des Sociétés de Microbiologie a décidé la création d'une Section spéciale de contrôle immunomicrobiologique et l'organisation à Lyon, sous son patronage, de la Première Rencontre Européenne de Standardisation biologique, du 21 au 25 juin 1955.

Le programme comporte l'étude du contrôle des anatoxines contre la diphtérie et le tétanos, des tuberculines en médecine humaine et vétérinaire, de la globuline γ et du vaccin contre la poliomyélite.

LIVRES RECUS

F. Scanga. — *La cellula batterica.* 1 vol., 477 p., 514 fig., Il Pensiero Scientifico, édit., Rome, 1954. Prix : 8 000 lire.

L'auteur a voulu attribuer au matériel iconographique une place prépondérante dans son ouvrage, afin de donner au lecteur une image aussi claire que possible de toutes les structures décrites. C'est ainsi que le livre comprend plus de 500 photographies au microscope électronique, qui montrent les bactéries sous tous leurs aspects possibles : bactéries normales d'espèces les plus diverses, avec leurs constituants (cils, granules, noyaux, etc.), bactéries en voie de multiplication (par scission, par bourgeonnement), formation des spores, bactéries attaquées par le bactériophage (un chapitre entier, merveilleusement illustré, est d'ailleurs consacré aux « virus bactériens »), altérations diverses apportées aux cellules bactériennes par les différents antibiotiques, photographies de virus et de rickettsies, d'inclusions cellulaires, de corpuscules élémentaires, etc. L'ouvrage se termine par un chapitre sur les techniques de coloration et autres servant à l'étude de la cytologie bactérienne, qui passe en revue les diverses réactions classiques, la méthode de bombardement par les rayons X, la microscopie en contraste de phase, sur fond noir, en ultraviolet et électronique.

La clarté de l'exposition comme l'abondance et la qualité des illustrations donnent à cet ouvrage un intérêt particulier et lui attribuent une valeur documentaire de premier plan. P. LÉPINE.

Actualités pharmacologiques, publiées sous la direction de René Hazard.
7^e Série. 1 vol., 210 p., Masson, édit., Paris, 1954. Prix : 1 480 frs.

Chaque année paraît un nouveau volume des *Actualités pharmacologiques*, qui constitue une mise au point des questions touchant les

nouveaux médicaments, leur mode d'action et les théories concernant les grands problèmes de la pharmacodynamie. Le présent ouvrage passe en revue les questions de l'acétylcholine, des résines échangeuses d'ions, des curares et anticurares de synthèse, du mode d'action des substances inflammatoires, des produits de transformation de la procaine, l'action analgésique de la morphine, l'antagonisme par analogie structurale, les succédanés du plasma humain, chacun de ces chapitres étant confié à un spécialiste du sujet qu'il traite. C'est dire l'intérêt et la valeur de ces mises au point qui ne le cèdent en rien à celles qui les ont précédées.

H. T.

P. Hauduroy. — *Problèmes actuels de Virologie*. 1 vol., 157 p., Masson, édit., Paris, 1954. Prix : 1 000 frs.

Le professeur Hauduroy a réuni à l'Institut d'Hygiène de Lausanne des spécialistes des questions de virologie et a rassemblé dans un volume, qui fait le point de ces diverses questions, les exposés qui ont été présentés. L'ouvrage contient les articles suivants : Problèmes actuels concernant les virus de la grippe, par M^{lle} G. Cateigne ; Les virus de Coxsackie, par G. Dalldorf ; Problèmes de l'immunisation contre la fièvre aphteuse dans la pratique, par G. Flückiger ; Les virus endormis, par P. Hauduroy ; Distinction entre les organismes du groupe de la pleuro-pneumonie et la phase L des bactéries ; leurs relations possibles avec les virus, par M^{me} E. Klieneberger-Nobel ; Aspects récents du problème de la poliomyélite (immunité et virus), par P. Lépine ; Le virus héréditaire de la drosophile, par P. L'Héritier ; Attaque et démolition de la cellule bactérienne par les phages, par G. Penso ; Le problème de la latence et de l'infection croisée dans les maladies à polyèdres des insectes, par K. Smith ; Le problème de l'immunisation dans les maladies à virus des animaux, par J.-L. Verge.

H. T.

Lectures on the scientific basis of medicine. 2^e volume. 1951-1953. 1 vol., 380 p., The Athlone Press, édit., Londres, 1954. Prix : 35 shillings.

La British Postgraduate Medical Federation a chargé des spécialistes de chaque discipline de faire tous les ans une série de conférences sur les bases scientifiques de la médecine. Ces conférences s'adressent aux jeunes travailleurs de laboratoire et aux cliniciens, et ont pour but de les mettre au courant des tout récents progrès réalisés dans le domaine de la physiologie, de la chimie, de la bactériologie, de l'immunologie ou de la thérapeutique. Un certain nombre de ces conférences sont publiées et c'est ainsi que le présent volume traite, entre autres, des nouveaux antibiotiques, des maladies à virus, du cancer, de la biochimie de la génétique, etc., chaque article étant accompagné de la bibliographie des derniers travaux sur la question. Cet ouvrage rendra les plus grands services à tous les médecins et sera sans aucun doute lu avec le plus vif intérêt.

H. T.

Tr. Baumgaertel. — *Klinische Darmbakteriologie*. 1 vol., VIII + 130 p. Georg Thieme édit., Stuttgart, 1953. Prix : DM : 14,40.

L'étude des bactéries de l'intestin a pris une importance particulière depuis que l'usage des antibiotiques a montré qu'en dehors des micro-organismes, simples commensaux de l'homme ou des animaux, il en existait d'autres qui jouaient un rôle important dans la synthèse de certaines vitamines ou par leur action antagoniste vis-à-vis de bacilles virulents. Le présent ouvrage, qui s'adresse surtout aux médecins praticiens, est une étude générale de tout ce qui concerne la question : métabolisme de ces bactéries, leur étude biochimique et sérologique, et, d'autre part, maladies qu'elles peuvent provoquer ; à ce propos, l'auteur donne les techniques de l'étude et de l'examen des selles et les méthodes d'isolement et de culture des diverses bactéries pathogènes. Un dernier chapitre est consacré à la thérapeutique.

H. T.

E. N. Willmer. — *Tissue culture*. 2^e édit., 1 vol., 175 p., 11 fig. Methuen and C^o, Londres, et John Wiley and Sons, New-York, édit., 1954. Prix : 9 sh. 6 d.

Il s'agit de la seconde édition de ce petit volume, dont la première avait paru en 1935. L'ouvrage fait partie de la collection des Monographies sur des sujets de biologie, dont plusieurs, fort intéressantes, ont déjà été publiées. Les progrès réalisés depuis quinze ans dans les techniques de culture de tissus rendaient nécessaires une mise au point de la question. Depuis 1935, des méthodes nouvelles ont été introduites, et en particulier celle des tubes roulants, et l'emploi des antibiotiques a permis d'obtenir des cultures stériles. Les caractéristiques du développement des divers types de cellules, leur métabolisme et les qualités que doivent remplir les milieux sont étudiés. On sait que les applications des cultures de tissus ont pris une importance considérable au cours de ces dernières années dans les recherches sur les virus. Elles pourraient être aussi d'une grande utilité dans l'étude des cellules cancéreuses. Enfin des organes entiers peuvent être mis en culture et maintenus en survie, ou bien encore des expériences très intéressantes peuvent être effectuées sur les tout premiers stades des embryons, permettant, au moyen entre autres de greffes entre embryons différents, d'étudier le mécanisme de la formation des divers organes.

H. T.

T. Mann. — *The biochemistry of semen*. 1 vol., 240 p., 16 fig., 7 pl. hors texte. Methuen and C^o, Londres, et John Wiley and Sons, New-York, édit., 1954. Prix : 16 shillings.

Ce petit volume est le cinquième de la série des monographies publiées par ces éditeurs et destinées à fournir aux lecteurs une vue d'ensemble de diverses questions de biochimie. Le présent ouvrage étudie d'abord la morphologie et la physiologie des spermatozoïdes et des glandes sexuelles secondaires ; puis les propriétés physiques et chimiques du liquide séminal et des spermatozoïdes, ainsi que les

techniques qui permettent d'évaluer leur qualité. D'autres chapitres sont consacrés aux inhibiteurs (influence de la chaleur, du froid, des radiations ionisantes, etc.), aux enzymes intracellulaires, aux métalloprotéines et nucléoprotéines et autres constituants des spermatozoïdes, au métabolisme qui fournit à ceux-ci l'énergie nécessaire à leur motilité, etc. L'ouvrage se termine par une bibliographie, qui comprend près de mille références et sera d'un précieux secours.

H. T.

J. D. N. Nabarro. — *Biochemical investigations in diagnosis and treatment*. 1 vol., 299 p., H. K. Lewis and Co, Londres, édit., 1954. Prix : 25 shillings.

Les recherches biochimiques prennent de plus en plus d'importance dans le traitement de toutes sortes de maladies. Elles peuvent rendre de précieux services pour le diagnostic et permettre un traitement approprié. Au cours des dix dernières années, un travail considérable a été réalisé dans ce domaine, mais les publications sont le plus souvent éparses dans divers périodiques, ou bien la question a été traitée par des biochimistes trop exclusivement préoccupés du point de vue du laboratoire. C'est pourquoi l'auteur a voulu écrire un livre s'adressant aux cliniciens et pouvant servir de guide pratique pour le médecin ou à l'hôpital. Il envisage successivement les métabolismes de l'eau et du sodium et leurs perturbations, l'équilibre acide-base, le rôle du potassium, du manganèse, du fer, du cuivre, le métabolisme du calcium, du phosphore, de l'azote, et les causes diverses qui peuvent entraîner son déséquilibre ainsi que les épreuves biochimiques à appliquer dans les divers cas. Puis vient l'étude du métabolisme des glucides et du diabète, du métabolisme des graisses, des maladies du tube digestif, du foie, du rein, et des tests fonctionnels. L'auteur décrit ensuite les différentes réactions pratiquées sur le liquide céphalo-rachidien, le fonctionnement des glandes endocrines, les hypo- et les hypervitaminoses, et enfin les diverses intoxications : par les barbituriques, l'alcool, intoxications professionnelles, etc. Quelques tableaux donnent des modèles d'analyse de sang, d'urine, de selles. Le livre se termine par un important index analytique.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.